

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Hubertus Maximilian Mehdorn)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EXPRESSION UND FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON
CHEMOKINEN UND STAMMZELLMARKERN IM RATTENGLIOM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

KRISTIN WOLLNY

aus **Kiel**

Kiel **2011**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Held-Feindt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24. April 2012

gez.: Prof. Dr. Nabavi
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Glioblastoma multiforme	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Histopathologie	1
1.1.3. Klinik und Diagnostik	2
1.1.4. Therapie und Prognose	2
1.2. Temozolomid	3
1.3. Chemokine	3
1.3.1. CXCL12/SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)	4
1.3.2. CXCR4	4
1.3.3. CXCR7	5
1.4. Stammzellmarker	5
1.4.1. CD133/Prominin-1	5
1.4.2. Nestin	6
1.4.3. SOX-2	6
1.4.4. Musashi-1	7
1.5. Zielsetzung	7
2. Material	9
2.1. Tiere	9
2.2. Chemikalien und Medizinprodukte	9
2.3. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	10

2.4. Puffer und Lösungen.....	11
2.5. Geräte und Verbrauchsmaterial	12
3. Methoden.....	14
3.1. Versuchsabschnitt an Wistar-Ratten	14
3.1.1. Versuchstiere.....	14
3.1.2. C6-Zellen	14
3.1.2.1. Kulturbedingungen und Kultivierung	14
3.1.2.2. Mediumwechsel und Splitten der C6 Zellen	15
3.1.2.3. Vorbereitung der C6 Zellen zur Injektion.....	15
3.1.3. Stereotaxie	16
3.1.3.1. Narkose und Analgesie	16
3.1.3.2. Stereotaxieablauf	16
3.1.4. Chemotherapie mit Temozolomid.....	17
3.1.5. Gewebeentnahme	18
3.1.6. Aufbereitung der Gewebeproben zur CXCR4, CXCR7, CXCL12 und CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 Bestimmung	19
3.1.6.1. RNA-Isolierung.....	19
3.1.6.2. Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung	20
3.1.6.3. DNA-Verdau.....	21
3.1.6.4. Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription.....	21
3.1.6.5. Real-Time RT-PCR	22
3.1.6.6. Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte.....	24
3.2. Versuchsabschnitt <i>in vitro</i>	26
3.2.1. Versuch zur Messung der Expression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in C6-Zellen.....	26
3.2.1.1. C6-Zellen	26
3.2.1.2. Kulturbedingungen und Kultivierung	26

3.2.1.3. Aussaat der C6-Zellen	26
3.2.1.4. Mediumwechsel und Stimulation der C6-Zellen	26
3.2.2. Versuch zur Messung der Proliferation von C6-Zellen	27
3.2.2.1. C6-Zellen	27
3.2.2.2. Kulturbedingungen und Kultivierung	27
3.2.2.3. Aussaat der C6-Zellen	27
3.2.2.4. Mediumwechsel und Stimulation der C6-Zellen	28
3.2.2.5. Aufbereitung der Stimulationsansätze	29
3.2.2.6. Berechnung der DNA-Menge	30
3.2.3. Versuch zur Messung der Apoptose von C6-Zellen	30
3.2.3.1. C6-Zellen	30
3.2.3.2. Kulturbedingungen und Kultivierung	30
3.2.3.3. Aussaat der C6-Zellen	30
3.2.3.4. Aufbereitung der Stimulationsansätze	32
3.2.3.5. Auszählen der beschädigten und gesunden Zellkerne	32
3.3. Statistische Analyse	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Ergebnisse des tierexperimentellen Versuchsabschnittes	33
4.1.1. Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	33
4.1.2. Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene in C6-Gliomen sowie im gesunden Hirngewebe mit und ohne Temozolomid-Therapie	34
4.1.2.1. Gruppe A	35
4.1.2.2. Gruppe B	38
4.1.2.3. Gruppe C	41
4.2. Ergebnisse des Versuchsabschnittes <i>in vitro</i>	46
4.2.1. Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in unstimulierten, mit Temozolomid stimulierten und mit DMSO behandelten C6-Zellen	46

4.2.2. Proliferationsverhalten von C6-Zellen.....	47
4.2.3. Apoptoseverhalten von C6-Zellen	49
5. Diskussion	53
6. Zusammenfassung	61
7. Literaturverzeichnis.....	63
8. Anhang	76
8.1. Ausführliche tabellarische Darstellung der Ergebnisse	76
8.1.1. <i>In vivo</i> - Ermittlung des Expressionsverhaltens von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene in C6-Gliomen sowie im gesunden Hirngewebe mit und ohne Temozolomid-Therapie (siehe 4.1.)	76
8.1.2. <i>In vitro</i> - Ermittlung des Expressionsverhaltens von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in unstimulierten, mit Temozolomid stimulierten und mit DMSO behandelten C6-Zellen (siehe 4.2.1.)	77
8.1.3. Proliferationsverhalten von C6-Zellen (siehe 4.2.2.).....	79
8.1.4. Apoptoseverhalten von C6-Zellen (siehe 4.2.3.).....	80
8.2. Danksagung.....	81
8.3. Lebenslauf	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Narkotisierte Wistar-Ratte liegt fixiert für die Stereotaxie im Stereotakter	17
Abb. 2: Narkotisierte Wistar-Ratte liegt fixiert zur Gewebsentnahme im Stereotakter	19
Abb. 3: Graphische Darstellung der CXCR4-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	36
Abb. 4: Graphische Darstellung der Nestin-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	37
Abb. 5: Graphische Darstellung der CXCR7-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	39
Abb. 6: Graphische Darstellung der Musashi-1-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	40
Abb. 7: Graphische Darstellung der CXCL12-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	42
Abb. 8: Graphische Darstellung der CD133-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	43
Abb. 9: Graphische Darstellung der SOX-2-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).....	44
Abb. 10: Graphische Darstellung der Mehrexpression unter Temozolomidstimulus.	47
Abb. 11: Graphische beispielhafte Darstellung des Proliferationsverhaltens von C6-Zellen.....	48
Abb. 12: Graphische Darstellung des apoptotischen Effektes von Temozolomid auf C6-Zellen.	50
Abb. 13: Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop	50
Abb. 14: Graphische Darstellung des apoptotischen Effektes von Temozolomid 200µg/ml, SDF-1 und CCX733 auf C6-Zellen.....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tiere.....	9
Tabelle 2: Chemikalien und Medizinprodukte.....	9
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reagenziensysteme.....	10
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	11
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterial.....	12
Tabelle 6: Ansatz zur Herstellung von cDNA.....	21
Tabelle 7: Reaktionsansatz der Real-Time PCR.....	24
Tabelle 8: Real-Time PCR-Programm.....	24
Tabelle 9: Stimuli der C6-Zellen zur Messung der Expression.....	27
Tabelle 10: Stimulationsansätze zur Messung der Proliferation von C6-Zellen.....	28
Tabelle 11: Pipettierschema zur Messung der Proliferation.....	29
Tabelle 12: Konzentrationsreihe mit Temozolomid zur Messung der Apoptose von C6-Zellen.....	31
Tabelle 13: Stimulationsansätze zur Messung der Apoptose von C6-Zellen.....	31
Tabelle 14: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere.....	33
Tabelle 15: Gruppeneinteilung der Chemokine und Stammzellmarker.....	34
Tabelle 16: Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene im <i>in vivo</i> -Versuch. Dargestellt sind die Δ CT-Werte und $\Delta\Delta$ CT-Werte.....	76
Tabelle 17: Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene im <i>in vitro</i> -Versuch.....	77
Tabelle 18: Proliferationsverhalten von C6-Zellen im <i>in vitro</i> -Versuch.....	79
Tabelle 19: Apoptoseverhalten von C6-Zellen im <i>in vitro</i> -Versuch bei Gabe von Temozolomid.....	80
Tabelle 20: Apoptoseverhalten von C6-Zellen im <i>in vitro</i> -Versuch bei Gabe von Temozolomid, SDF-1 und CCX733 in verschiedenen Kombinationen.....	80

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillatum (<i>lat.</i> Doppelt destilliertes Wasser)
A. dest.	Aqua destillatum (<i>lat.</i> destilliertes Wasser)
CCX733	Antagonist (<i>griech.</i> Gegenspieler) von CXCR7
cDNA	copy (<i>engl.</i> Kopie-) DNA
CD133	Stammzellmarker, auch bekannt als Prominin-1
CO_2	Kohlendioxid
CT	Threshold Cycle (<i>engl.</i> Schwellenwertzyklus)
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12, auch bekannt als stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
durch.	durchschnittlich
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (<i>lat.</i> und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GITC	Guanidinisothiocyanat
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
HIF	Hypoxia Inducible Factor (<i>engl.</i> Hypoxie-induzierter Faktor)
HMG	high mobility group
K	Kontrolltier
KCL	Kaliumchlorid
KG	Kommanditgesellschaft
KG	Körpergewicht
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
min	Minute
mRNA	Messenger (<i>engl.</i> Boten-) RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTIC	Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid
Musashi-1	Stammzellmarker
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Nestin	Stammzellmarker
NH_2	Ammoniumradikal, bestehend aus Stickstoff und Wasserstoff
NTC	no-template-control (<i>engl.</i> Leerprobe)

OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (<i>engl.</i> Polymerase Kettenreaktion)
pH	Potentia hydrogenii (<i>lat.</i> Stärke des Wasserstoffs), negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Prominin-1	Stammzellmarker, auch bekannt als CD133
qPCR	quantitative PCR, Synonym für Real-Time PCR
RBD	RNA-Bindungsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
SD	standard deviation (<i>engl.</i> Standardabweichung)
SDF-1	stromal cell-derived factor-1, auch bekannt als CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12)
SOX-2	sex determining region Y-related HMG box 2, Stammzellmarker
T	Therapietier
Tem	Temozolomid
U	Unit(s) Enzymaktivität
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UV	Ultraviolettlicht
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die chemischen Elemente in Formeln wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt.

Präfixe für die üblichen Längen, Maß und Gewichtseinheiten

m	Meter
c	Centi
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano
Da	Dalton
M	Mol
l	Liter
k	Kilo
g	Gramm

1. Einleitung

1.1. Glioblastoma multiforme

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Der Begriff Glioblastoma multiforme wurde 1926 von Percival Bailey und Harvey Cushing geprägt. Er basierte auf der Vorstellung, dass sich der Tumor aus Glioblasten entwickelt sowie der Beobachtung, dass er ein sehr multiformes Erscheinungsbild mit Nekrosen, Einblutungen und Zysten zeigt (Bailey et Cushing 1926).

Das Glioblastoma multiforme ist ein hochmaligner, glialer Tumor astrozytären Ursprungs. Die WHO unterteilt die Astrozytome in vier Grade (I-IV) mit aufsteigender Malignität (Kleihues et al. 1995). Das Glioblastoma multiforme wird dabei als Grad-IV-Gliom klassifiziert (Louis et al. 2007). Mit einem Anteil von 15-20% ist er der häufigste primäre Hirntumor (Ohagaki et Kleihues 2005; McLendon et al. 2011) und gleichzeitig der bösartigste (McLendon et Rich 2011). Das Glioblastoma multiforme kann entweder *de novo* (sog. primäres Glioblastom) entstehen oder das Endstadium einer fortschreitenden Entdifferenzierung eines anfangs niedrig malignen Astrozytoms sein (sekundäres Glioblastom) (Goetz et Pappert 2003).

Mit Entdeckung der neuronalen Stammzellen im zentralen Nervensystem kam es zu Spekulationen, dass diese Zellen über eine Dysregulierung des Zellerneuerungsmechanismus zu einem Hirntumor führen können. Tumorzellen, die Eigenschaften von neuronalen Stammzellen besitzen, nennt man daher tumorale Stammzellen (Ma et al. 2008). Die Tumorstammzell-Theorie besagt, dass der Tumor sich aus einer einzelnen, sich selbst erneuernden Zellpopulation entwickelt, die einen Wachstumsimpuls an die umliegenden Tumorzellen gibt (Ma et al. 2008; Rahman et al. 2010).

1.1.2. Histopathologie

Das Glioblastoma multiforme ist vorzugsweise in der weißen Hirnsubstanz des Frontal- und Temporallappens lokalisiert. Bei Kindern ist nicht selten auch der Hirnstamm betroffen. Histologisch zeichnet sich die Malignität durch zentrale Nekrosen, Zellreichtum, Gefäßproliferation, Zellkernpolymorphie, hohe Mitoseraten

sowie Invasivität aus (Louis et al. 2007). Die palisadenförmige Anordnung der Tumorzellkerne entlang der Nekrosen ist ein weiteres typisches Bild (Kleihues et al. 1993).

1.1.3. Klinik und Diagnostik

Menschen, die an einem Glioblastoma multiforme erkrankt sind, präsentieren sich gewöhnlich mit subakuten, progredienten neurologischen Defiziten, typischerweise fokalneurologischen Ausfällen oder Persönlichkeitsveränderungen entsprechend der Lokalisation des Tumors im Gehirn. In 20-40% der Fälle sind epileptische Anfälle eines der ersten klinische Symptome eines Glioblastoma multiforme (Moots et al. 1995). Der als Folge des erhöhten intrakraniellen Drucks auftretende unspezifische Kopfschmerz ist ebenfalls häufig (Matkovic et al. 1984).

Besteht der Verdacht auf einen Hirntumor, wird die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel als bildgebendes Verfahren durchgeführt.

Eine korrekte neuroonkologische Therapie setzt als Goldstandard die histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes voraus, um die Diagnose zu bestätigen. Hierfür ist zumindest eine stereotaktische Biopsie erforderlich.

1.1.4. Therapie und Prognose

Die derzeitige Therapie der Wahl muss als palliativ verstanden werden (Stummer et Steiger 2002). Sie besteht in der möglichst radikalen Resektion des Glioblastoma multiforme. Mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure kann intraoperativ das Glioblastomgewebe besser sichtbar gemacht und damit gezielter reseziert werden (Stummer et al. 2000).

Zur Eliminierung einzelner ins umliegende Gewebe infiltrierter Tumorzellen erfolgt anschließend standardisiert die Radiatio mit konkomitanter und adjuvanter Chemotherapie. Die Dosierung erfolgt nach dem 2005 veröffentlichten Stupp-Schema (Stupp et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die konkomitante und adjuvante Anwendung von Radio- und Chemotherapie die Überlebenschancen der Patienten im Vergleich zur alleinigen Radiatio signifikant erhöht. Die Zwei-Jahre-Überlebensrate steigt von 10,4% bei alleiniger Radiatio auf 26,5% bei adjuvanter Anwendung von Chemotherapie und Radiatio an (Stupp et al. 2005; Yang et al. 2008).

Trotz aller Möglichkeiten der heutigen Therapie liegt die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs bei nur 6,9 Monaten und die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei unter 5%, wobei ein höheres Lebensalter als negativer prädiktiver Faktor anerkannt ist (Ohagaki et Kleihues 2005; Stupp et al. 2009).

Chemo- sowie Radiotherapie sind derzeit noch nicht in der Lage, alle Tumorzellen vollständig zu entfernen, da es eine Population an Zellen innerhalb des Tumors gibt, die resistent gegen Chemotherapie und Radiatio ist und dem induzierten Zelltod entkommen kann. Diese Zellen können nach einiger Zeit wieder in den Zellzyklus eintreten und so zu einem Rezidiv führen. Bei diesen Zellen könnte es sich um tumorale Stammzellen handeln (Gilbert et Ross 2009).

1.2. Temozolomid

Das Imidazo-Tetrazin-Derivat Temozolomid (Temodal®) ist ein lipophiles, Blut-Hirn-Schranken-gängiges Alkylans, das seine Wirksamkeit bei verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren, einschließlich des malignen Glioblastoms, bewiesen hat (Yung 2000; Brada et al. 2001).

Nach oraler Gabe wird Temozolomid mit 97% Bioverfügbarkeit resorbiert (Ostermann et al. 2004). Durch Hydrolyse bei physiologischem pH-Wert entsteht daraus der aktive Metabolit Monomethyl-triazeno-imidazol-carboxamid (MTIC), dessen Zytotoxizität auf der Methylierung der O⁶ Position von Guanin mit sich anschließender Alkylierung der N⁷ Position beruht (Newlands et al. 1992; Ostermann et al. 2004).

Temozolomid ist über diesen Mechanismus in der Lage, die Ausschüttung von p53 zu induzieren und die Apoptose von Zellen herbeizuführen (D'Atri et al. 1998).

Temozolomid verzögert die Progression des Krankheitsverlaufes und kann so die mit der Gesundheit verbundene Lebensqualität des Patienten erhalten (Yung 2000).

1.3. Chemokine

Chemokine umfassen eine kleine Gruppe meist löslicher Peptidmediatoren (Held-Feindt et al. 2008). Ihr Molekulargewicht beträgt 6-14 kDa (Held-Feindt et al. 2008; Terasaki et al. 2011). Chemokine werden von mehreren Zelltypen produziert. Unter anderem konnte deren Expression durch Gliomstammzellen nachgewiesen werden (Hattermann et al. 2010). Sie besitzen eine Vielzahl von Funktionen (Held-Feindt et al. 2008). So erhöhen Sie die Proliferationsrate (Hogaboam et al. 1999), regulieren

die Angiogenese (Strieter et al. 1995) und nehmen Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung (Luca et al. 1997).

Es scheint daher von besonderem Interesse, den Wirkungsmechanismus von Chemokinen zu weiter untersuchen, um die Therapie des Glioblastoma multiforme weiter voranzutreiben.

1.3.1. CXCL12/SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)

Das Chemokin CXCL12/SDF-1 gehört zur Gruppe der CXC Chemokine, welche eine der vier Hauptgruppen der Chemokine darstellt. CXCL12 spielt eine bedeutende Rolle in der Tumordinvasion, Proliferation und Metastasierung (Hattermann et al. 2010). Es reguliert Neoangiogenese, Angiogenese, Stammzellbeweglichkeit (Burns et al. 2006) und besitzt antiapoptotische Eigenschaften (Hattermann et al. 2010). Dabei vermittelt CXCL12 seine Effekte durch die Bindung an zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, CXCR4 und CXCR7 (Burns et al. 2006; Hattermann et al. 2010; Terasaki et al. 2011; Watanabe et al. 2010). CXCL12 ist oftmals mit CXCR4 colokalisiert (Hattermann et al. 2010). Mit zunehmender Tumormalignität steigt auch die Expression von CXCL12 an (Rempel et al. 2000).

1.3.2. CXCR4

CXCR4 ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren. CXCR4 ist ein G-Protein-gekoppelter Transmembranrezeptor mit sieben Transmembran-Domänen (Maksym et al. 2009). Der NH₂-Terminus dieses Rezeptors befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. CXCR4 bindet spezifisch nur ein einziges Chemokin, CXCL12 (SDF-1). Die Bindung von CXCL12 erfolgt in zwei Schritten. Als erstes interagiert die N-terminale Region von CXCR4 mit den Aminosäuren 12-17 von CXCL12. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine Bindung der N-terminalen Region von CXCL12 an weitere Regionen von CXCR4 ermöglicht wird. Erst diese zweite Bindung führt zu einer bioaktiven Konformation des Rezeptors (Crump et al. 1997; Huang et al. 2003).

CXCR4 wird von Tumorzellen exprimiert (Schutyser et al. 2007) und ist außerdem auf stammzellartigen Gliomzellen angesiedelt (Hattermann et al. 2010). Die Expression von CXCR4 sinkt dabei mit zunehmendem Differenzierungsstatus der Zellen (Hattermann et al. 2010). Im Glioblastoma multiforme zeigt sich zudem im Vergleich zu gesundem Gewebe ein statistisch signifikant erhöhter Wert von CXCR4

exprimierenden Zellen (Ma et al. 2008). Diese beiden Aspekte sprechen für eine Expression von CXCR4 in dedifferenzierten, eventuell Tumorstammzellen ähnlichen Zellen. CXCR4 spielt außerdem in der Angiogenese eine wichtige Rolle und wird im Glioblastoma multiforme bei Hypoxie durch HIF-1alpha hochreguliert (Zagzag et al. 2006). Die Blockierung von CXCR4 induziert einen signifikanten Anstieg der Apoptose (do Carmo et al. 2010). Die Interaktion zwischen CXCR4 und CXCL12 beeinflusst zudem die Zellwanderung und Proliferation (do Carmo et al. 2010; Rempel et al. 2000).

1.3.3. CXCR7

CXCR7 ist ein G-Protein-gekoppelter Transmembranrezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren (Hou et al. 2010). Er besitzt sieben Transmembran-Domänen und bindet mit hoher Affinität die Chemokine CXCL11 und CXCL12 (Hattermann et al. 2010; Hou et al. 2010). CXCR7 wird von Tumorendothelzellen, Mikrogliazellen und allen Gliomzelllinien exprimiert, während das Vorkommen von CXCR4 deutlich eingeschränkter ist und auf nur einer von acht Gliomzelllinien nachgewiesen werden konnte (Hattermann et al. 2010). Mit zunehmender Zelldifferenzierung steigt auch die Expression von CXCR7 drastisch an (Hattermann et al. 2010) und wird außerdem unter Hypoxie hochreguliert (Schutyser et al. 2007). CXCR7 ist ein funktioneller Rezeptor für CXCL12 in Glioblastomen und verhindert die durch Temozolomid induzierte Apoptose. Der selektive Antagonist von CXCR7 ist CCX733. Er reduziert den antiapoptotischen Effekt von CXCR7 auf CXCL12 (Hattermann et al. 2010; Watanabe et al. 2010).

1.4. Stammzellmarker

Um tumorale Stammzellpopulationen innerhalb eines Tumors nachweisen zu können, bedient man sich bestimmter Marker. Dazu zählen unter anderem CD133/Prominin-1, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 (Ma et al. 2008).

1.4.1. CD133/Prominin-1

CD133 ist ein pentaspan-transmembran Glycoprotein, welches einen bedeutenden Oberflächenmarker verschiedener Stammzellpopulation, gesund und tumorös, darstellt (Fargeas et al. 2007). Innerhalb eines Tumors finden sich CD133-positive Zellen häufig in Gruppen angeordnet und mit Tumorgefäßen assoziiert (Thon et al.

2010). CD133 wurde als tumoraler Stammzellmarker beim Glioblastoma multiforme, Ependynom, Medulloblastom und bei Prostatakrebs nachgewiesen (Ma et al. 2008). Im Vergleich zu gesundem Hirngewebe kann CD133 im Glioblastoma multiforme vermehrt nachgewiesen werden (Ma et al. 2008). Die Expression von CD133 korreliert dabei beim Glioblastoma multiforme mit dem Grad der Malignität (WHO I-IV), wobei mit zunehmender Malignität auch die Expression ansteigt (Ma et al. 2008; Thon et al. 2010).

1.4.2. Nestin

Nestin ist ein Protein mit einem Gesamtmolekulargewicht von 198 kDa und gehört zur Gruppe der Intermediärfilamente. Diese sind wie Mikrotubuli und Mikrofilamente wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts. Nestin wird während der Entwicklung von multipotenten neurodermalen Stammzellen aus allen Regionen des ZNS exprimiert. Im ausgewachsenen Hirn gilt es als Marker für neuronale Stammzellen (Dahlstrand et al. 1992 a, b; Kleeberger et al. 2007; Ma et al. 2008). Nestin konnte in primären Hirntumoren, Melanomgewebe, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen und in dukta len Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Dahlstrand et al. 1992 a, b; Ehrmann et al. 2005; Flørenes et al. 1994; Brychtova et al. 2007; Li et al. 2007; Kleeberger et al. 2007; Kawamoto et al. 2009).

In differenzierten Geweben kommt es zu einer verminderten Nestin-Expression (Michalczyk et Ziman 2005). Dahingegen ist die Expression von Nestin im Glioblastoma multiforme deutlich erhöht und korreliert mit dem Grad der Tumormalignität (Ma et al. 2008).

1.4.3. SOX-2

Der Transkriptionsfaktor SOX-2 (sex determining region Y-related HMG box 2) gehört zur Familie der High Mobility Group (HMG) DNA Proteine. HMG Proteine binden an die kleine Furche der Doppelhelix und erzeugen eine starke Beugung des DNA-Stranges (Fang et al. 2011). SOX-Proteine haben eine 79 Aminosäuren große HMG box Domäne, die für die sequenzspezifische Bindung am DNA-Strang verantwortlich ist (Gubbay et al. 1990; Wright et al. 1993).

SOX-2 ist eines der Schlüsselmitglieder der SOX-Familie und wird in mindestens drei Typen von Stammzellen nachweislich exprimiert. Nämlich in neuronalen, embryonalen und trophoblastischen Stammzellen (Ma et al. 2008).

SOX-2 ist ein bekannter Marker, um tumorale Stammzellpopulationen innerhalb eines Astrozytoms nachweisen zu können (Ma et al. 2008). Die Menge des Markers korreliert dabei mit dem Grad der Malignität (Ma et al. 2008).

Dabei ist SOX-2 sowohl für die Proliferation neuronaler Stammzellen als auch für die Proliferation tumoraler neuronaler Stammzellen verantwortlich. Es scheint, dass SOX-2 fundamental an der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungseigenschaften neuronaler Stammzellen beteiligt ist, wenn diese tumorale Eigenschaften erworben haben. In Abwesenheit von SOX-2 stoppt die Zellproliferation sofort, ungeachtet der verschiedenen Differenzierungsgrade (Gangemi et al. 2009; Fang et al. 2011). Außerdem führt eine Ruhigstellung von SOX-2 innerhalb eines Glioblastoma multiforme zum Verlust der Tumorgenität (Gangemi et al. 2009).

1.4.4. Musashi-1

Musashi-1 gehört zur einer Gruppe von RNA-bindenden Proteinen, die ausschließlich von neuronalen Progenitor- und Stammzellen exprimiert werden (Ma et al. 2008; Ohyama et al. 2008). Das Musashi-1-Protein bindet an die 3' Position der noch nicht replizierten target mRNA und unterdrückt deren Translation (Ohyama et al. 2008). Dabei verfügt es über zwei hintereinander liegende RNA-Bindungsdomänen (RBD), RBD1 und RBD2. Die Bindungsdomänen interagieren miteinander und führen zu einer kooperativen Bindung des Musashi-1-Proteins an die target mRNA (Ohyama et al. 2008).

Musashi-1 spielt während der embryonalen Entwicklung des ZNS eine wichtige Rolle, indem es den Status der Stammzellen aufrecht erhält (Ma et al. 2008). Außerdem ist Musashi-1 ein hervorragender Marker, um neuronale Progenitor- und Stammzellen im erwachsenen Gehirn nachweisen zu können. Die Expression von Musashi-1 konnte in Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nachgewiesen werden, wobei die Expression mit dem Grad der Malignität korreliert (Ma et al. 2008).

Das Ausschalten von Musashi-1 führt zu einem Stillstand des Tumorwachstums, Rückgang der Proliferation und einem Anstieg der Apoptose (Sureban et al. 2008).

1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, wie das Glioblastoma multiforme im Hinblick auf die Expression und funktionelle Bedeutung von Chemokinen sowie

verschiedenen Stammzellmarkern unter der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid (Temodal®) reagiert.

Dafür bieten sich insbesondere mit C6-Zellen induzierte Gliome sowohl im Tierexperiment mit Wistar-Ratten (Grobbs et al. 2002) als auch *in vitro* an. C6-Zellen werden aus einem Rattengliom geklont. C6-Gliome weisen Zeichen der Malignität, wie hohe Mitoseraten, Tumornekrosen, intratumorale Blutungen, Infiltration ins umliegende Gewebe und gelegentliche Bildung von Ödemflüssigkeit auf und sind damit dem humanen Glioblastoma multiforme am ähnlichsten (Grobbs et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde mittels qPCR evaluiert, ob sich innerhalb der gebildeten C6-Gliome bestimmte Marker nachweisen lassen und in welcher Weise diese temozolomidsensitiv reagieren. Diese sind die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und der dazugehörige Chemokinligand CXCL12 sowie die Stammzellmarker CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1.

Des Weiteren wurde das Proliferations- und Apoptoseverhalten von C6-Zellen unter dem Einfluss von Temozolomid sowie bei der Zugabe von CXCL12 und des CXCR7-Inhibitors CCX733 in verschiedenen Kombinationen getestet.

2. Material

Die verwendeten Tiere, Chemikalien und Medizinprodukte, gebrauchsfertige Reagenziensysteme, Puffer, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind mit deren Bezugsquelle in nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

2.1. Tiere

Tabelle 1: Tiere

Tiere	Bezugsquelle
Wistar-Ratte, männlich	Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld

2.2. Chemikalien und Medizinprodukte

Tabelle 2: Chemikalien und Medizinprodukte

Chemikalien und Medizinprodukte	Bezugsquelle
Bepanthen Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Chloralhydrat 4%	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
C6-Zelllinie, Rattenglom, Nr. ACC 550,	DSMZ GmbH, Braunschweig
CCX733	ChemoCentryx, Mountain View, CA, USA
CXCL12 (SDF-1)	Pepro Tech GmbH, Hamburg
Dietylether	BÜFA Chemikalien GmbH&Co. KG, Lübeck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 25mM	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS) 10%	Life Technologies, Darmstadt
L-Glutamin 3%	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Knochenwachs	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kochsalzlösung (NaCl)	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Penicillin-Streptomycin 3%, <i>in vivo</i>	Life Technologies, Darmstadt

Penicillin-Streptomycin 1%, <i>in vitro</i>	Life Technologies, Darmstadt
Random Hexamer Primer, 0,2µg/µl	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Scandicain 1%	AstraZeneca GbmH, Wedel
Ssniff R-Z	Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest
Temozolomid, Temodal®, <i>in vivo</i>	Essex Pharma GmbH, München
Temozolomid, Temodal®, <i>in vitro</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Merck Pharma GmbH, Darmstadt
Trypsin-EDTA 1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasserstoffperoxid 3%	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe

2.3. Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	Bezugsquelle
CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DNase	Promega, Madison, WI, USA
DNase-Puffer	Promega, Madison, WI, USA
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase, 200u/µl	Fermentas, Glen Burnie, MD, USA
Target Assay CXCR4, Rn00573522_s1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay CXCR7, Rn00584358_m1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay CXCL12, Rn00573260_m1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay CD133, Rn00572720_m1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay Nestin, Rn00564394_m1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay SOX-2, Rn01286286_g1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Target Assay Musashi-1, Rn00596059_m1	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA
Taqman Universal Master Mix, 20x	Applied Biosystems, Branchburg, NJ,

	USA
TRizol-Reagenz®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Menge
Verdünnter Lysis-Puffer	Lysis-Puffer Konzentrat aus CyQuant Cell Proliferation Assay Kit A. dest. von Firma Merck, Darmstadt	1ml 19ml
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung), selbst angesetzt pH-Wert 7,2 – 7,3	Na ₂ HPO ₄ x 1H ₂ O KH ₂ PO ₄ KCL NaCl A. bidest Alle Bestandteile bezogen von Merck Pharma GmbH, Darmstadt	1,15g 0,2g 0,2g 8,0g Auffüllen auf 1l Gesamtvolumen
2 x Reagenz	CyQuant GR aus CyQuant Cell Proliferation Assay Kit verdünnter Lysis-Puffer	50µl 10ml
RNase	RNase Sigma R- 6513 (DNase frei) von Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München A. dest. von Merck Pharma GmbH, Darmstadt vor Gebrauch 20µl gelöste RNase + 180µl A. dest. verdünnen (1:10)	10mg (=0,8 U/ml) lösen in 1ml

2.5. Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Brutschrank, Heracell 240	Hereaus GmbH, Langenselbold
Cups, 0,2ml und 1,5ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Digitalkamera, AxioCam MRC5	Carl Zeiss GmbH, Jena
Einmalskalpell, Fig. 11	Aesculap GmbH, Tuttlingen
Einmalspritzen, BD Discardit 2 10ml	Becton Dickison GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen für die Chemotherapie, Luer-Lock, Medallion®	Merit Medical Systems, South Jordan, Utah, USA
Eismaschine, AF-10	Scotsman, Glasgow, Schottland
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
Faden, 4-0 Perma-Hand	Ethicon GmbH, Norderstedt
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss GmbH, Jena
Folie, optische Folie	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fräse, diamantierte Fräse in Nadelform 0,14, Komet®	Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo
Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln
Gewebsstanze, Biopsy Punch	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Hamilton®-Mikrospritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kanülen, Sterican®, Gr. 17, 0,55 x 0,25 BL/LB,	Braun Melsungen AG, Melsungen
Klebeband, Transpore 3M	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kühlschrank	National Lab GmbH, Mölln
Mastercycler®	Eppendorf AG, Hamburg
Mikropinzette, FD 280	Aesculap GmbH, Tuttlingen
Mikroschere, FD 16	Aesculap GmbH, Tuttlingen
Mikroskop, Wild M3Z	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Mikrotiterplatte	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nahtmaterial, 2/0 Mersilene	Ethicon GmbH, Norderstedt
PCR-Softtubes, 0,2ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
PCR-Detektionssystem, iQ5™ Multi	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Color Real-Time PCR Detection System + Laptop und iCycler Optical System Power Supply	
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG, Nümbrecht
Photometer, Ultrospec 3100 pro	Amersham Bioscience Europe GmbH
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht
Pipettierhilfe, Macro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Rosenbohrer, Stahlbohrer Kugelfräse 0,05, Komet®	Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo
Safe-Lock-Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
Stereotakter	TSE Systems GmbH, Bad Homburg und David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Ultraturrax, IKA-Ultraturrax®, T 25 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortexer, REAX 2000	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen
well-Platten, 6-well und 96-well	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zentrifuge, Rotilab Minizentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge, Biofuge pico	Hereaus GmbH, Osterode
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg

Alle weiteren nicht näher bezeichneten Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprachen dem üblichen Laborstandard.

3. Methoden

Es wurden sowohl Versuche *in vivo* an Wistar-Ratten (3.1.) als auch *in vitro* durchgeführt (3.2.).

3.1. Versuchsabschnitt an Wistar-Ratten

3.1.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 6 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden 10 Tage vor Beginn der Versuchsreihe bezogen. Sie hatten ein Gewicht von 120g - 140g. Die Tiere wurden vor und während der Experimente im zentralen Tierstall des UKSH unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 21°C, Luftfeuchtigkeit 50%) in einem Polycarbonkäfig gehalten. Bei Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Gewicht bei 179,2g. Das durchschnittliche Endgewicht der Versuchstiere (T1-T4) lag nach 18 Tagen Versuchsdauer bei 300,8g. Das Endgewicht der Kontrolltiere (K1, K2) betrug durchschnittlich 324g. Die Fütterung erfolgte mit Ssniff R-Z, ein Alleinfutter für die Rattenzucht, und Leitungswasser. Die Tiere wurden täglich von ausgebildeten Tierpflegern versorgt. Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und mit Genehmigung des Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, V31 Tierschutz (Tierversuchsantrag Nr. V 313-72241.121-35 (58-5/07)).

3.1.2. C6-Zellen

Die C6-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Die C6-Zellen wurden aus einem Rattengliom geklont, welches durch N-Nitrosomethylurea induziert wurde.

3.1.2.1. Kulturbedingungen und Kultivierung

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Kulturschalen. Das für die C6-Zellen verwendete Wachstumsmedium setzte sich aus DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zusammen. Pro Kulturschale wurde eine Gesamtmediummenge von 7ml verwendet. Dieses wurde alle 2 Tage gewechselt.

3.1.2.2. Mediumwechsel und Splitten der C6 Zellen

Zum Wechsel des Mediums wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde neues Medium hinzugegeben, welches sich erneut aus DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zusammensetzte.

Zum Splitten der Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde für die Dauer von 20 Sekunden 1ml Trypsin auf die Platte gegeben, um die adhärent wachsenden Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurde das Trypsin wieder abgesaugt und die Platte für 3 Minuten in den Brutschrank gelegt. Noch nicht vollständig vom Boden abgelöste Zellen wurden durch leichtes Beklopfen des Schalenbodens mobilisiert. Danach wurde mit 5ml Medium (DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zu gleichen Volumina auf neue Kulturschalen verteilt und auf ein Gesamtvolumen von 7ml aufgefüllt.

3.1.2.3. Vorbereitung der C6 Zellen zur Injektion

Um eine Zellsuspension von 20×10^6 in 5 μ l Medium, bestehend aus DMEM, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, für die Stereotaxie (2.3.) zu erhalten, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und für 20 Sekunden 1ml Trypsin beigelegt, um eine vollständige Mobilisierung der Zellen zu erreichen. Danach wurde die Schale für 3 Minuten in den Brutschrank gestellt. Am Schalenboden persistierende Zellen wurden anschließend durch leichtes Beklopfen des Bodens gelöst. Die Zellen wurden mit 5ml Medium (DMEM, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in einem Falcon Tube® gemischt. 25 μ l Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 mit 25 μ l Trypanblau verdünnt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und durch Zugabe der notwendigen Menge Medium (DMEM, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) auf eine Konzentration von 20×10^6 Zellen in 5 μ l Medium DMEM, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin eingestellt. Bis zur Zellinjektion wurde die Suspension in einem Safe-Lock-Reaktionsgefäß in einem Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.

3.1.3. Stereotaxie

3.1.3.1. Narkose und Analgesie

Um die Therapie- und Kontrolltiere möglichst schonend zu narkotisieren, wurde eine kurze Inhalationsnarkose mit Äther durchgeführt. Dafür wurden die Tiere einzeln in ein Glasgefäß gesetzt, dessen Deckel mit Äther getränkt war. Kamen die Tiere zur Ruhe, verharrten regungslos und zeigten auch auf adäquate Schmerzreize keine Reaktion, so wurden sie anschließend mit Chloralhydrat narkotisiert. Dieses wurde in einer Dosierung von 1ml pro 100g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Tiefe der Narkose wurde anhand der Atemfrequenz und der Reaktion auf adäquate Schmerzreize beurteilt.

Die lokale Analgesie erfolgte mittels subkutaner Verabreichung von Scandicain. Zur Injektion wurden Einmalspritzen und Kanülen verwendet.

3.1.3.2. Stereotaxieablauf

Nach dem vollständigen Eintritt der Narkose wurde die Kopfhaut über der Schädelkalotte rasiert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen Augensalbe geschützt. Anschließend wurde das Tier in Bauchlage und mit horizontal ausgerichtetem Kopf durch zwei Stützstifte im Porus acusticus externus im Stereotaxer fixiert. Anschließend wurde mittels eines 2cm langen, über der Sutura sagittalis verlaufenden Hautschnittes die Kopfhaut eröffnet und die Schädelkalotte freipräpariert. Das Operationsfeld wurde mit zwei Nadelhaltern aufgespannt. Die Schädelkalotte wurde mit Wasserstoffperoxid gereinigt und desinfiziert. Zusätzlich wurden durch diesen Schritt die Schädelnähte eindeutig identifizierbar gemacht. Anschließend wurde 3mm lateral und 1mm rostral des Bregmas mit einem Rosenbohrer stereotaktisch ein Loch durch die Schädelkalotte der linken Hemisphäre gebohrt und die Dura mater mittels Stichinzision eröffnet. Die für das Anlegen des Bohrloches notwendigen Koordinaten stammen aus dem Stereotaxie-Atlas für Rattenhirne (Paxinos et Watson 1986). Zielstruktur der Stereotaxie war das Corpus striatum (Nucleus caudatus und Putamen).

In das Bohrloch wurde stereotaktisch die Nadel einer 5µl Hamilton®-Mikrospritze in die Tiefe von 5,5mm vorgeschoben, ausgehend von der Schädelkalottenoberfläche. Anschließend wurde die Nadel 0,5mm zurückgezogen, um für die zu applizierende Zellsuspension eine Mulde zu schaffen. Die Vorschiebe- und Rückziehgeschwindigkeit der Nadel betrug 1mm/min. Pro Tier wurden 5µl

Zellsuspension mit einer Geschwindigkeit von 1 μ l/min injiziert. Um ein Aufsteigen der Zellsuspension im Stichkanal zu verhindern und ein möglichst zirkuläres Wachstum der C6-Zellen zu erreichen, wurde eine Wartezeit von 2 Minuten eingehalten. Anschließend wurde die Nadel der Hamilton®-Mikrospritze mit der oben genannten Geschwindigkeit zurückgezogen. Nach dem vollständigen Entfernen der Nadel aus dem Stichkanal wurde das Bohrloch mit Knochenwachs und der Hautschnitt mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Diese Arbeitsabläufe erfolgten in Anlehnung an die 1973 erstmalig von Barker et al. beschriebene stereotaktische Implantation einer im Labor gezüchteten Zellsuspension (Barker et al. 1973).

Nach Beendigung des Eingriffes wurde das Tier in seinen Käfig zurückgelegt und vor Unterkühlung geschützt.

In der sich anschließenden zehntägigen Wachstumsphase der Gliome wurden die Tiere wie unter 2.1. beschrieben versorgt. Außerdem wurden die Therapie- und Kontrolltiere regelmäßig gewogen und beobachtet, um auszuschließen, dass sie unter Komplikationen des Tumorwachstums wie Blutungen, Lähmungen oder Krampfanfällen leiden.



Abb. 1: Narkotisierte Wistar-Ratte liegt fixiert für die Stereotaxie im Stereotakter. Die Kopfhaut wurde eröffnet und ein Loch 3mm lateral des Bregmas in die Schädelkalotte gebohrt, eine 5 μ l-Hamilton-Spritze ist vertikal ins Hirn vorgeschoben.

3.1.4. Chemotherapie mit Temozolomid

Nach 10-tägiger Tumorwachstumsphase wurden die vier Therapietiere (T1-T4) eine Woche lang mit Temozolomid therapiert. Temozolomid wurde in einer Dosierung von

20mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag verabreicht. Dies entspricht 222mg/m² Körperoberfläche (Qingyu et al. 2007). Das Chemotherapeutikum wurde intraperitoneal verabreicht. Zur Injektion wurden Einmalspritzen verwendet.

Die Kontrolltiere (K1, K2) erhielten während der einwöchigen Temozolomidgabe keine Therapie.

3.1.5. Gewebeentnahme

Nach Beendigung der einwöchigen Chemotherapie mit Temozolomid wurden Therapie- und Kontrolltiere wie unter 2.3.1. beschrieben narkotisiert. Anschließend wurde die Schädelkalotte rasiert. Dazu wurde das Tier im Stereotakter wie unter 2.2.3. beschrieben fixiert. Die Kopfhaut wurde mittels eines 2cm langen, über der Sutura sagittalis verlaufenden Schnitts eröffnet und die Schädelkalotte freipräpariert. Das Operationsfeld wurde mit Hilfe von zwei Nadelhaltern aufgespannt. Die Schädelkalotte wurde mit Wasserstoffperoxid gereinigt und desinfiziert. Dann wurde mit Hilfe eines Rosenbohrers und einer diamantierten Fräse auf jeder Hemisphäre eine kreisrunde Öffnung mit einem Durchmesser von 5mm angelegt. Die eine Öffnung wurde direkt auf die Stelle der Tumorzellinjektion gelegt, die zweite Öffnung wurde in die gesunde Hemisphäre gelegt und besaß denselben Abstand zur Sutura sagittalis. Aus beiden Bohrlöchern wurde mit Hilfe einer Gewebsstanze Hirnparenchym entnommen. Der Stanzdurchmesser betrug 5mm. Die Länge der Schneide betrug 7mm. Die Gewebsstanze wurde immer auf ganzer Länge ins Hirnparenchym eingeführt. Die Gewebeproben wurden in Safe-Lock-Reaktionsgefäßen verwahrt und unverzüglich in flüssigem Stickstoff bei -180°C kryofixiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.



Abb. 2: Narkotisierte Wistar-Ratte liegt fixiert zur Gewebesentnahme im Stereotakter. Die Schädelkalotte ist freigelegt und die erste Öffnung zur Gewebesentnahme wurde angelegt.

3.1.6. Aufbereitung der Gewebeproben zur CXCR4, CXCR7, CXCL12 und CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 Bestimmung

3.1.6.1. RNA-Isolierung

Zur Untersuchung der CXCR4-, CXCR7-, CXCL12-, CD133-, Nestin-, SOX-2- und Musashi-1-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR wurde zunächst die Gesamt-RNA aus C6-Tumoren und gesundem Hirngewebe der Ratte isoliert.

Zu diesem Zweck wurden 100mg kryokonserviertes Gewebe mit 1ml TRIzol®-Reagenz, einer gebrauchsfertigen Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, versetzt und mittels eines Ultraturrax homogenisiert. Das Grundprinzip dieses Einschnittverfahrens wurde erstmals von Chomczynski und Sacchi 1987 beschrieben und basiert auf einer quantitativen Denaturierung von RNasen durch Guanidinisothiocyanat (GITC), einer sauren Phenolextraktion sowie einer Isopropanfällung (Chomczynski et Sacchi 1987). Das Homogenisat wurde in ein steriles Cup gegeben und zur Trennung der löslichen Bestandteile vom Zelldetritus 10min bei 12000xg und 2-8°C zentrifugiert. Nach Inkubation des flüssigen, die RNA enthaltenden Überstandes für 5min bei Raumtemperatur erfolgte die Durchmischung nach Zugabe von 200µl Chloroform/ml TRIzol® für 15-30s. Anschließend wurden die für 2-3min inkubierten Proben für 15min bei 12000xg und 2-8°C zentrifugiert. Es bildete sich eine Phasentrennung: Eine obere wässrige Phase (RNA), eine Interphase (DNA) und eine untere rote Chloroform-Phenol-Phase (Proteine und Zelldetritus).

Der obere RNA-haltige Überstand (ungefähr 60% des Gesamtvolumens) konnte von den anderen Phasen getrennt und zur Ausfällung in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500µl Isopropanol versetzt werden. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zentrifugation bei 12000xg und 2-8°C. Das vorher nicht sichtbare RNA-Präzipitat erschien nach dem Zentrifugieren als weißes, gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Durch erneutes Entfernen des Überstandes wurde das Pellet durch Vortexen in 1ml 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (für 5min bei 7500xg und 2-8°C) und nach Abpipettieren der wässrigen Phase getrocknet (5-10min). Durch Lösen in 50µl RNase-freiem A. dest., mehrmaligem Durchmischen und anschließender Inkubation für 10min bei 55-60°C konnte die gewonnene RNA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

3.1.6.2. Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung

Um gleiche Mengen an RNA zu verwenden, ist die Ermittlung des RNA-Gehaltes der vorher isolierten Probe durch UV-spektroskopische Messung unabdingbar.

Hierzu erfolgte nach Kalibrierung einer mit A. dest. gefüllten Küvette auf den Nullwert die Extinktionsmessung einer mit A. dest. auf 1:100 verdünnten RNA-Lösung (Wert hier: 5µl RNA, 495µl A. dest.).

Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260nm, das der Proteine bei 280nm. Die Quantifizierung der RNA in der Probe errechnet sich aus der Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1cm 40µl/ml RNA. Zur Konzentrationsbestimmung einer RNA-Lösung findet somit folgende Gleichung Anwendung (Sambrook et al. 1989):

$$[1] \quad \text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung}_{\text{Küvette}} = \text{RNA } [\mu\text{g/ml}]$$

Um eine Aussage über Verunreinigungen der Probe durch Proteine oder Phenol treffen zu können, muss der Quotient aus den Absorptionsmaxima von 260nm und 280nm gebildet werden:

$$[2] \quad \text{Extinktionswert}_{260\text{nm}} / \text{Extinktionswert}_{280\text{nm}}$$

Ein Quotient zwischen 1,8-2,0 spricht für eine saubere RNA-Isolierung, während ein Wert kleiner 1,8 auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen, ein Wert größer 2,0 auf eine Verunreinigung mit Phenol schließen lässt.

3.1.6.3. DNA-Verdau

Zur Eliminierung genomischer DNA aus der Gesamt-RNA wurde im Vorfeld der Real-Time RT-PCR ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 1µg Gesamt-RNA in 7µl RNase freiem Wasser gelöst. Die Menge des zu verwendenden RNA-Templates errechnet sich aus den vorher spektrometrisch gewonnenen Extinktionswerten ($1\mu\text{l RNA} / \text{Extinktionswert} = x\mu\text{l}$). Anschließend wurde 1µl DNase (1U/µl), sowie 1µl des dazugehörigen 10xDNase-Puffers hinzu gegeben, und das Ganze für 15min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch unverzüglich auf Eis gestellt, zentrifugiert und mit 1µl EDTA (Ethyldiamintetraacetat, 25mM) versetzt. Eine erneute Inkubation bei 65°C für 15min zur Inaktivierung des vorher zugesetzten Enzyms beendete den Vorgang.

3.1.6.4. Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Da ausschließlich cDNA durch Real-Time RT-PCR detektiert werden kann, musste die isolierte RNA mittels Reverser Transkription umgewandelt werden. Die Synthese der cDNA erfolgte dabei mit „RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase“ (200U/µl). Dem auf Eis stehenden RNA-Template wurde als Primer 2µl Random Hexamer (0,2µg/µl), ein aus willkürlich ausgewählten, kurzen Oligonukleotidsequenzen bestehendes und über die gesamte Länge der RNA unspezifisch bindendes Transkriptat, beigefügt, anschließend wurde es bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Vervollständigung des Ansatzes geschah mit folgenden Komponenten:

Tabelle 6: Ansatz zur Herstellung von cDNA

	Volumen	Konzentration
Reaction Buffer	4µl	5 x
dNTP-Mix	2µl	10mM
H ₂ O	ad 19µl	
Inkubation bei 25°C für 5min		

Im Anschluss wurde dem Ansatz 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt, gefolgt von zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, Erwärmung auf 42°C für 60min sowie zehnminütigem Erhitzen auf 70°C, um die Reaktion zu beenden. Die bei der Reversen Transkription hergestellte cDNA diente nun als Template für die Real-Time RT-PCR.

3.1.6.5. Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) ist eine sensitive, reproduzierbare Methode, welche die Expression eines Gens mittels Echtzeit-PCR nachweist. Im Vergleich zur konventionellen RT-PCR kann bei der Real-Time RT-PCR eine genaue Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgen. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Außerdem ist es durch die Real-Time RT-PCR möglich, die Amplifikation der PCR-Produkte über den gesamten Reaktionsverlauf zu visualisieren und die DNA-Menge innerhalb des logarithmisch-linearen Anstiegsbereichs zu ermitteln. Der eigentlichen Real-Time RT-PCR voraus gehen spezielle Schritte: die RNA-Isolierung, die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung, der DNA-Verdau und die Reverse Transkription.

Die Durchführung der Real-Time RT-PCR erfolgte in diesem Versuchsaufbau nach dem Taqman-Prinzip mittels eines iQ5™ Multi Color Real-Time PCR Detection Systems, einer Kombination aus Thermocycler und Fluoreszenzoptik. Dieses homogene System ermöglicht die simultane Messung der Fluoreszenzprodukte und damit die Bestimmung des PCR-Produkts während der Amplifikationsreaktion. Die Quantifizierung der PCR-Produkte basiert dabei auf der softwaregestützten Berechnung des Fluoreszenzschwellenzyklus, dem sogenannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Dieser bezeichnet jene Zykluszahl, bei der die Reporterfluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Dafür wird dem PCR-Ansatz, neben den für die Amplifikation notwendigen spezifischen Primern, eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugefügt, welche an die zu amplifizierende cDNA bindet. Dieses als Taqman-Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist am 3'Ende mit einem fluoreszenzlöschenden Quencherfarbstoff (Rhodamin-Derivat) und 5'Ende terminal mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszin-Derivat) verknüpft. Bei

Anregung der intakten Sonde durch ultraviolettes Licht wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffes aufgrund der engen räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet. Während der Primerverlängerung im Rahmen der PCR-Reaktion wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Endonuklease-Aktivität der Taqman-Polymerase hybridisiert. Aufgrund dieser Trennung wird der räumliche Abstand zwischen Quencher und Reporter vergrößert, der Energietransfer geringer und der Reporter-Farbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren. Da freie und nicht hybridisierte Sonden nicht gespalten werden, ist die Zunahme der Reporterfluoreszenz zu jedem Zeitpunkt der Reaktion proportional zu der Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Neben den spezifischen Primern und Hybridisierungssonden, die eine Quantifizierung der RNA-Menge ermöglichen, wird zur Bestimmung der relativen Quantifizierung zwischen verschiedenen Proben ein Parallelansatz mit einem internen Standard als Referenz benötigt. Als Standard dient oftmals das „housekeeping-gene“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Von diesem nimmt man an, dass es in den untersuchten Ansätzen selbst nicht transkriptionell reguliert wird (Bustin 2000). Zusätzlich wird für jeden Primer eine „no-template-control“ (NTC) angesetzt, die als Kontrollmechanismus für Primerverunreinigung dient. Bei sauberer Arbeitsweise dürfen in diesem Reaktionsansatz keine Amplifikate gebildet werden.

Die Real-Time RT-PCR wurde in 2 Replikationen jeder Probe (Gesamtvolumen: 20µl) mittels eines Multi Color Real-Time PCR Detection System sowie Taqman-Primer-Proben und Target Assays durchgeführt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz der Real-Time PCR

Reaktionsansatz	Volumen	Konzentration
Target Assay CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2, Musashi-1	1µl	20 x
Taqman Universal Master Mix	10µl	2 x
gelöst in 7µl RNase-freiem H ₂ O		
Volumen des Reaktionsansatzes pro well	18µl	
Pro well vorgelegt: 10ng bzw. 100ng cDNA gelöst in 2µl RNase-freiem H ₂ O	2µl	
Gesamtvolumen pro well	20µl	

Auf die Platte wurde pro well 2µl cDNA-Template vorgelegt, entsprechend 10ng bzw. 100ng. Anschließend wurde jedes well der 96-well-Platte mit 18µl des Reaktionsansatzes aufgefüllt.

Die Platte wurde anschließend mit optischer Folie verschlossen. Jede Platte erhielt zur Negativkontrolle gleichzeitig 3 Leerproben (NTC).

Zur Analyse erfolgte die Überführung der Platten in das iQ5TM Multi Color Real-Time PCR Detection System und der Start des entsprechenden Real-Time RT-PCR-Programms.

Tabelle 8: Real-Time PCR-Programm

UNG-Aktivierung:	2min bei 50°C
Polymerase-Aktivierung:	10min bei 95°C
Denaturierung:	15sec bei 95°C
Annealing und Kettenverlängerung:	1min bei 60°C

Der Prozess der Denaturierung sowie das anschließende Annealing und die Kettenverlängerung laufen in 40 Zyklen ab.

3.1.6.6. Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte

Um neben der Quantifizierung der mRNA-Expression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 innerhalb einer Probe auch eine Analyse der Expressionsunterschiede zwischen tumorösem Gewebe und gesundem Hirnparenchym vornehmen zu können, wurde als interner positiver Standard

gleichzeitig GAPDH mitgetestet. Durch den Vergleich mit diesem internen Standard ist eine relative Abschätzung der vorhandenen Menge CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 zwischen den verschiedenen Proben möglich. Die relative Quantifizierung erfolgte über die Ermittlung der sogenannten ΔC_T -Werte. Der Berechnung der ΔC_T -Werte liegt folgende Formel zugrunde:

$$[3] \quad \Delta C_T = ({}_{10}CT_x - 3,3 + {}_{100}CT_x) / 2 - ({}_{10}CT_{GAPDH} - 3,3 + {}_{100}CT_{GAPDH}) / 2$$

CT_x gibt die Thresholdzyklen für die Zielsequenz, in diesem Ansatz CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1, und CT_{GAPDH} die Thresholdzyklen für GAPDH wieder. ${}_{10}CT_x$ und ${}_{100}CT_x$ stellen die CT-Werte der unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen (10ng und 100ng) einer Probe dar. Das Vorgehen beinhaltet die Subtraktion der 10ng CT-Werte einer Gewebeprobe minus 3,3 sowie Addition mit den 100ng CT-Werten und anschließender Bildung des Mittelwertes. Ein äquivalentes Vorgehen wurde für die CT-Werte von GAPDH durchgeführt und die Ergebnisse im Anschluss voneinander subtrahiert. Dabei ist der ΔC_T -Wert proportional zum Logarithmus der Templatmenge im Reaktionsansatz. Zum weiteren Vergleich von tumorösem und gesundem Hirnparenchym wurde anschließend der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt:

$$[4] \quad \begin{aligned} &\Delta\Delta C_T\text{-Wert}_{CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 \text{ und Musashi-1}} \\ &= 2^{-\Delta C_T(T_x)} / 2^{-\Delta C_T(K_x)} \end{aligned}$$

$\Delta C_T(T_x)$ bzw. $\Delta C_T(K_x)$ stehen dabei für die gemittelten ΔC_T -Werte des Tumorgewebes (T_x) sowie der gesunden Kontrollseite (K_x). Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert gibt die n-fache Über- oder Unterexpression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 des Tumorgewebes im Verhältnis zum gesunden Hirnparenchym der gegenüberliegenden Hemisphäre an.

3.2. Versuchsabschnitt *in vitro*

3.2.1. Versuch zur Messung der Expression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in C6-Zellen

3.2.1.1. C6-Zellen

Die C6-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Sie wurden aus einem Rattengliom geklont, welches durch N-Nitrosomethylurea induziert wurde.

3.2.1.2. Kulturbedingungen und Kultivierung

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Es wurden sterile Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert.

3.2.1.3. Aussaat der C6-Zellen

Die C6-Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurde soviel Trypsin in die Zellkulturflaschen pipettiert, dass alle Zellen damit bedeckt waren. Durch ein kurzes Schwenken wurde das Trypsin gleichmäßig verteilt. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Zellkulturflaschen für 3-5min im Brutschrank platziert, bis eine vollständige Ablösung der Zellen von den Zellkulturflaschen erfolgt war. Danach wurde das Trypsin durch die Zugabe von Wachstumsmedium inaktiviert. Das Wachstumsmedium setzte sich zusammen aus DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Es wurden jeweils 100.000 Zellen auf drei Zellkulturflaschen verteilt, die in jeweils 2ml Wachstumsmedium (DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) gelöst waren. Insgesamt wurden drei Versuchsdurchläufe durchgeführt.

3.2.1.4. Mediumwechsel und Stimulation der C6-Zellen

Nach 24 Stunden wurde das Medium in den Zellkulturflaschen gewechselt. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend erhielt jede Zellkulturflasche 2ml neues, sogenanntes Mangelmedium (DMEM, 0,5% FKS), da es sonst im Versuchsverlauf zu einer überschießenden Zellproliferation käme.

Die Stimulantien der drei Zellkulturflaschen sind nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 9: Stimuli der C6-Zellen zur Messung der Expression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1.

Zellkulturflaschen Nr.	Stimulus und Konzentration
1	unstimuliert
2	0,1% DMSO, entspricht 2µl
3	40µg Temozolomid (20µg/ml)

Die erste Flasche erhielt keine weitere Behandlung. Die Zellen blieben unstimuliert. Die zweite Zellkulturflasche wurde mit 0,1% DMSO, das entspricht 2µl, versetzt. Die dritte Zellkulturflasche wurde mit 40µg Temozolomid versetzt.

Die drei Zellkulturflaschen wurden für 48 Stunden im Brutschrank belassen. Danach wurde der oben erläuterte Vorgang wiederholt. Die Zellkulturflaschen wurden nun für 72 Stunden im Brutschrank belassen, bevor sich der Ablauf erneut wiederholte. Es wurde erneut 48 Stunden abgewartet. Nun wurden die Zellen zweimalig mit PBS gespült und das PBS abgesaugt. Zu jeder Zellkulturflasche wurde 1ml TRIzol®-Reagenz hinzugefügt. Die Zellen wurden abgekratzt und in beschriftete Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen wie unter Abschnitt 3.1.6. beschrieben ausgewertet.

3.2.2. Versuch zur Messung der Proliferation von C6-Zellen

3.2.2.1. C6-Zellen

Entsprechend 3.2.1.1.

3.2.2.2. Kulturbedingungen und Kultivierung

Entsprechend 3.2.1.2.

3.2.2.3. Aussaat der C6-Zellen

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie unter 3.2.1.3. beschrieben. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Ein well einer 6-well-Platte enthielt 1ml Wachstumsmedium, bestehend aus DMEM, 10% FKS 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Pro well wurden 50.000 Zellen ausgesät. Der Versuch

beinhaltete 8 Stimulationsansätze, wovon jeder Stimulus auf drei unabhängigen 6-well-Platten erfolgte.

3.2.2.4. Mediumwechsel und Stimulation der C6-Zellen

Die Zellen wurden nach der Aussaat für 24 Stunden zum Anwachsen in den Brutschrank gestellt. Danach erfolgte der Wechsel des Nährmediums wie unter 3.2.1.4. beschrieben. Das neu hinzugefügte Mangelmedium bestand aus DMEM und 0,5% FKS. Zusätzlich erfolgte der Stimulus der acht Versuchsarme. Die Stimulantien sind nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 10: Stimulationsansätze zur Messung der Proliferation von C6-Zellen

Versuchsarm Nr.	Stimulus und Konzentration
1	unstimuliert
2	SDF-1 1nM
3	DMSO 1%
4	DMSO 1%, SDF 1nM
5	Temozolomid 20µg/ml
6	Temozolomid 20µg/ml, SDF-1 1nM
7	Temozolomid 100µg/ml
8	Temozolomid 100µg/ml, SDF-1 1nM

Versuchsarm 1 blieb unstimuliert. Versuchsarm 2 erhielt eine Stimulation durch SDF-1 1nM. Der dritte Versuchsarm erhielt eine Zugabe von DMSO 1%. Zum vierten Versuchsarm wurde DMSO 1% in Kombination mit SDF-1 1nM gegeben. Versuchsarm 5 erhielt Temozolomid in der Dosierung 20µg/ml. Der sechste Versuchsarm erhielt ebenfalls Temozolomid 20µg/ml, allerdings in Kombination mit SDF-1 1nM. Der siebente Versuchsstrang erhielt Temozolomid 100µg/ml und der achte Therapiearm erhielt ebenfalls Temozolomid 100µg/ml, versetzt mit SDF-1 1nM.

Anschließend wurden die 6-well-Platten für eine Gesamtdauer von fünf Tagen in den Brutschrank gestellt. Nach drei Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums (DMEM,

10% FCS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin), der wie unter 3.2.1.4. beschrieben durchgeführt wurde.

3.2.2.5. Aufbereitung der Stimulationsansätze

Nach weiteren zwei Tagen erfolgte die Aufbereitung der Stimulationsansätze durch das Absaugen des Mediums aus den einzelnen wells und sich anschließender 2-facher Spülung mit PBS. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen für 24 Stunden bei -30°C gelagert. Danach wurden die Zellen aufgetaut und in jedes well 250µl vorbereiteter verdünnter Lysis-Puffer mit 5µl RNase gegeben. Die RNase sollte die RNA zerstören und verhindern, dass sich im späteren Ablauf der Fluoreszenzfarbstoff daran bindet. Zur vollständigen Lyse wurden nachfolgend die 6-well-Platten mitsamt dem Inhalt für eine Stunde auf Eis inkubiert. An die Inkubation schloss sich die Überführung der Zellen in Eppendorfgefäße an. Dazu wurden die 6-well-Platten schräg gehalten, die Zellen mit Hilfe eines Zellkratzers sorgfältig nach unten hin abgekratzt und in das jeweilige beschriftete Gefäß pipettiert.

Die Weiterverarbeitung geschah nach dem in folgender Tabelle aufgeführten Ansatz.

Tabelle 11: Pipettierschema zur Messung der Proliferation

	Lysat	DNA-Standard (50ng DNA = 10.000 Zellen)	Verdünnter Lysis-Puffer	2 x Reagenz
Leerwert	-	-	250µl	250µl
Probe	50µl	-	200µl	250µl
Standard	-	50µl	200µl	250µl

Vor jeder Zugabe musste das Zelllysate gevortext werden. Die Menge des Zelllysats wurde nach folgendem Prinzip festgesetzt: Eine konfluente Kultur besteht aus etwa einer Million Zellen. In 25µl Zelllysate befinden sich demnach 100.000 Zellen. Bei erwarteten 500.000 Zellen pro Kultur kann man 50µl Zelllysate und 200µl verdünnten Lysis-Puffer mischen. In 50µl Zelllysate sind dann wiederum 100.000 Zellen enthalten. Durch Einlagerung in die DNA-Doppelhelix änderte der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff sein Absorptionsmaximum (480nm). Die Emissionsstrahlung wurde im Fluoreszenzphotometer bei einer Extinktion von 480nm und 520nm gemessen. Es bestand hierbei eine Linearität zwischen Intensität und DNA-Menge.

3.2.2.6. Berechnung der DNA-Menge

Die DNA-Konzentration der einzelnen Proben ergab sich nach Umstellung der folgenden Formel:

Korrigierter Standard: Standard (50ng DNA = 10.000 Zellen) – Leerwert

Korrigierter Probenwert: Probenwert – Leerwert

$$[5] \quad \frac{\text{Korrigierter Probenwert} \times 50}{\text{Korrigierter Standard}} \times \text{Verdünnung} = \text{DNA-Menge}$$

3.2.3. Versuch zur Messung der Apoptose von C6-Zellen

3.2.3.1. C6-Zellen

Entsprechend 3.2.1.1.

3.2.3.2. Kulturbedingungen und Kultivierung

Entsprechend 3.2.1.2.

3.2.3.3. Aussaat der C6-Zellen

Das Ablösen der C6-Zellen ist unter 3.2.1.3. nachzulesen. Anschließend wurden die Zellen auf Deckgläsern mit einer Poly-D-Lysin-Oberfläche ausgesät. Als Nährmedium wurde DMEM, 10% FKS, 3% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugegeben und die C6-Zellen wurden zum Anwachsen für einen Tag in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Medium wie unter 3.2.1.4. beschrieben gewechselt und gegen ein Mangelmedium bestehend aus DMEM mit 0,5% FKS ausgetauscht. Nun erfolgte die Zugabe der verschiedenen Stimulationsansätze. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen zu 50%-70% konfluent auf den Deckgläsern angewachsen.

Der erste Versuchsabschnitt bestand aus fünf Therapiearmen und untersuchte die Effekte verschiedener Temozolomidkonzentrationen auf die C6-Zellen. Die Stimulantien und Konzentrationen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 12: Konzentrationsreihe mit Temozolomid zur Messung der Apoptose von C6-Zellen

Deckglas Nr.	Stimulus
1	DMSO 2%
2	Temozolomid 100µg/ml
3	Temozolomid 200µg/ml
4	Temozolomid 400µg/ml
5	Temozolomid 600µg/ml

Deckglas 1 wurde DMSO 2% hinzugefügt. Deckglas 2 wurde mit Temozolomid 100µg/ml stimuliert. Dem dritten Deckglas wurde Temozolomid in der Konzentration von 200µg/ml hinzugefügt. Deckglas 4 wurde mit 400µg/ml Temozolomid stimuliert und Deckglas 5 wurde Temozolomid 600µg/ml hinzugefügt.

Der zweite Versuchsabschnitt bestand aus acht Therapiearmen und untersuchte die Effekte von Temozolomid in Kombination mit SDF-1 und CCX733 auf die C6-Zellen. Die Stimulantien und Konzentrationen sind nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 13: Stimulationsansätze zur Messung der Apoptose von C6-Zellen unter dem Einfluss von Temozolomid, SDF-1 und CCX733 in verschiedenen Kombinationen.

Deckglas Nr.	Stimulus
1	DMSO 1%
2	DMSO 1%, SDF-1 1nM
3	DMSO 1%, CCX733 100nM
4	DMSO 1%, SDF-1 1nM, CCX733 100nM
5	Temozolomid 200 µg/ml
6	Temozolomid 200 µg/ml, SDF-1 1nM
7	Temozolomid 200 µg/ml, CCX733 100nM
8	Temozolomid 200 µg/ml, SDF-1 1nM, CCX733 100nM

Deckglas 1 wurde DMSO 1% hinzugefügt. Deckglas 2 wurde mit DMSO 1% und SDF-1 1nM stimuliert. Dem dritten Deckglas wurde DMSO 1% in Kombination mit CCX733 100nM hinzugefügt. Deckglas 4 wurde mit DMSO 1%, SDF-1 1nM und CCX733 100nM stimuliert. Deckglas 5 wurde Temozolomid 200µg/ml hinzugefügt.

Dem sechsten Deckglas wurde Temozolomid 200µg/ml und SDF-1 1nM beigefügt. Deckglas 7 wurde mit Temozolomid 200µg/ml in Kombination mit CCX733 100nM stimuliert und das achte Deckglas erhielt Temozolomid 200µg/ml, SDF-1 1nM und CCX733 100nM in Kombination. Von allen Ansätzen wurden Mehrfachwerte angelegt.

3.2.3.4. Aufbereitung der Stimulationsansätze

Nach 48 Stunden wurde die Stimulation beendet, indem die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch die 10-minütige Zugabe einer eisgekühlten Lösung aus Aceton und Methanol (Mischungsverhältnis 1:1) fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimalig gewaschen und gemäß Nicoletti-Staining (Nicoletti et al. 1991) mit DAPI angefärbt. Die Deckgläser wurden eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Pro Deckglas wurden sechs Gesichtsfelder ausgezählt.

3.2.3.5. Auszählen der beschädigten und gesunden Zellkerne

Um objektive Werte zu erhalten, erfolgte das Auszählen der gesunden und der beschädigten Zellkerne durch eine am Versuch unbeteiligte Person. Pro Deckglas wurden sechs Gesichtsfelder ausgezählt.

3.3. Statistische Analyse

Als statistische Größen wurden die arithmetischen Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichungen (SD) gemäß den üblichen Methoden verwendet. Die Signifikanzprüfung wurde mit einem homoskedatischen zweiseitigen Student'schen T-Test ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p galt bei $p < 0.05$ als statistisch signifikant und wurde mit * markiert. Bei $p < 0,01$ wurden die Differenzen als statistisch sehr signifikant gewertet und mit ** markiert. Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ galt als hoch signifikant und wurde mit *** gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Versuchsergebnisse erläutert und graphisch dargestellt. Das vollständige Zahlenmaterial ist im Anhang tabellarisch aufgeführt (siehe 8.1.).

4.1. Ergebnisse des tierexperimentellen Versuchsabschnittes

4.1.1. Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

Für den tierexperimentellen Versuchsabschnitt wurden sechs männliche Wistar-Ratten verwendet. Diese wurden 10 Tage vor Versuchsbeginn mit einem Gewicht von 120g-140g bezogen (siehe 3.1.1.). An Tag 1 des Versuches wurden allen Tieren mit Hilfe der Stereotaxie C6-Zellen in die linke Hemisphäre injiziert (siehe 3.1.3.). Nach 10-tägiger Tumorwachstumsphase begann am elften Tag für die Therapietiere T1-T4 die siebentägige Therapie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid (Temodal®). Am 18. Tag erfolgte die Gewebeentnahme aus den C6-Gliomen der Rattenhirne (siehe 3.1.5.). Über die gesamte Versuchsdauer wurde das Gewicht der Versuchstiere alle 3-4 Tage kontrolliert. Der genaue Gewichtsverlauf ist nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 14: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere (in g). Therapietiere (T1-T4), Kontrolltiere (K1, K2), S=Stereotaxie, T=Therapiebeginn bei den Therapietieren, G=Gewebsentnahme

	Tag 1 S	Tag 4	Tag 8	Tag 11 T	Tag 13	Tag 16	Tag 18 G
T1	180	208	237	270	281	278	280
T2	170	217	256	300	307	305	271
T3	175	235	263	284	305	318	333
T4	170	223	262	295	313	310	319
durch. Gewicht	173,75 =100%	220,75	254,5	287,25	302,5	302,75	300,75 =173,09%
K1	195	226	267	355	351	343	338
K2	185	216	240	264	284	290	310
durch. Gewicht	190,0 =100%	221	253,5	309,5	317,5	316,5	324,0 =170,52%

Aus der Gewichtstabelle geht hervor, dass die Therapietiere T1-T4 insgesamt ein geringeres Ausgangs- und Endgewicht aufwiesen als die Kontrolltiere K1 und K2. Die durchschnittliche prozentuale Gewichtszunahme ist allerdings mit 73% bei den Therapie- und 71% bei den Kontrolltieren annähernd gleich. Die einwöchige Gabe von Temozolomid hatte also auf die Gewichtsentwicklung der Therapietiere einen nur geringfügig positiven Effekt, während die Nichtbehandlung der C6-Gliome der Kontrolltiere zu einer minimal geringeren durchschnittlichen Gewichtszunahme führte.

4.1.2. Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene in C6-Gliomen sowie im gesunden Hirngewebe mit und ohne Temozolomid-Therapie

Zur Bestimmung der in C6-Gliomen und gesundem Hirngewebe von Wistar-Ratten vorhandenen CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 mRNA-Mengen mit und ohne Gabe von Temozolomid wurde aus kryokonservierten Gewebeproben die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgten: DNA-Verdau, cDNA-Synthese und Reverse Transkription Real-Time PCR.

Die mRNA-Expressionsdaten der gemessenen Chemokine und Stammzellmarker ließen sich hinsichtlich der Temozolomidsensitivität und der Expressionsunterschiede zwischen C6-Gliomen und gesundem Hirngewebe in drei Gruppen einteilen.

Tabelle 15: Gruppeneinteilung der Chemokine und Stammzellmarker hinsichtlich ihres Expressionsmusters und der Temozolomidsensitivität.

Gruppe	Unterscheidungsmerkmale	Chemokine/ Stammzellmarker
A	Es fanden sich deutliche Unterschiede der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor, unabhängig von der Temozolomidtherapie	CXCR4 Nestin
B	Es fanden sich im Allgemeinen geringe Unterschiede der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor, unabhängig von der Temozolomidtherapie	CXCR7 Musashi-1
C	Es fanden sich im Allgemeinen geringe Unterschiede	CXCL12/SDF-1

	der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor im Therapietier, aber deutlichere Unterschiede der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor im Kontrolltier	CD133 SOX-2
--	--	----------------

Die folgenden Abbildungen zeigen die Resultate der Real-Time PCR-Analyse in graphischer Form. Der Δ CT-Wert spiegelt die mRNA-Expression wider. Dabei korrespondiert eine hohe mRNA-Expression mit einem niedrigen Δ CT-Wert, während eine niedrige mRNA-Expression durch einen hohen Δ CT-Wert ausgedrückt wird. Bei der Real-Time PCR handelt es sich um ein logarithmisches Verfahren. Das bedeutet, dass ein um 3,3 erhöhter oder erniedrigter Δ CT-Wert einer 10-fach erhöhten oder erniedrigten mRNA-Expression des untersuchten Chemokins/Stammzellmarkers entspricht. Der Expressionsunterschied zwischen dem gesunden Hirngewebe und den C6-Gliomgewebe wird durch den $\Delta\Delta$ CT-Wert wiedergegeben.

4.1.2.1. Gruppe A

Zu dieser Gruppe gehören der Chemokinrezeptor CXCR4 und der Stammzellmarker Nestin.

Es fanden sich hier deutliche Unterschiede der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor. Sowohl bei den Therapietieren (T1-T4) als auch bei den Kontrolltieren (K1, K2) war die mRNA-Expression von CXCR4 und Nestin im tumorösen Gewebe im Vergleich zum gesunden Hirngewebe deutlich erhöht und ist somit unabhängig von der Therapie mit Temozolomid.

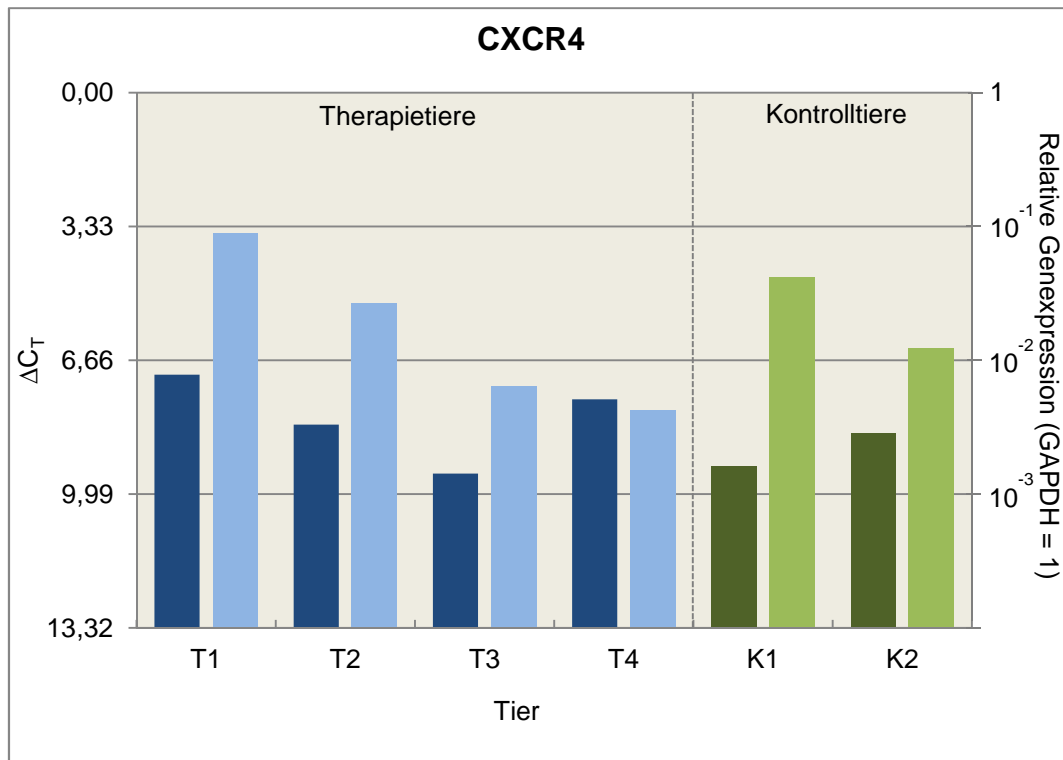


Abb. 3: Graphische Darstellung der CXCR4-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Darstellung der mittels Real-Time PCR ermittelten ΔC_T -Werte. Durch Normalisierung mit GAPDH wurde der ΔC_T -Wert jeder Probe ermittelt. Eine hohe mRNA-Expression korrespondiert dabei mit einem niedrigen ΔC_T -Wert, eine niedrige mRNA-Expression wird durch einen hohen ΔC_T -Wert demonstriert. Wegen der logarithmischen Verhältnisse der ΔC_T -Werte untereinander gibt ein 3,3-facher Unterschied eine 10-fache Expressionsdifferenz (Über- oder Unterexpression) an.

Die mRNA-Expression von CXCR4 ist sowohl bei den Therapietieren als auch bei den Kontrolltieren im Tumorgewebe deutlich erhöht und reagiert somit temozolomidunabhängig.

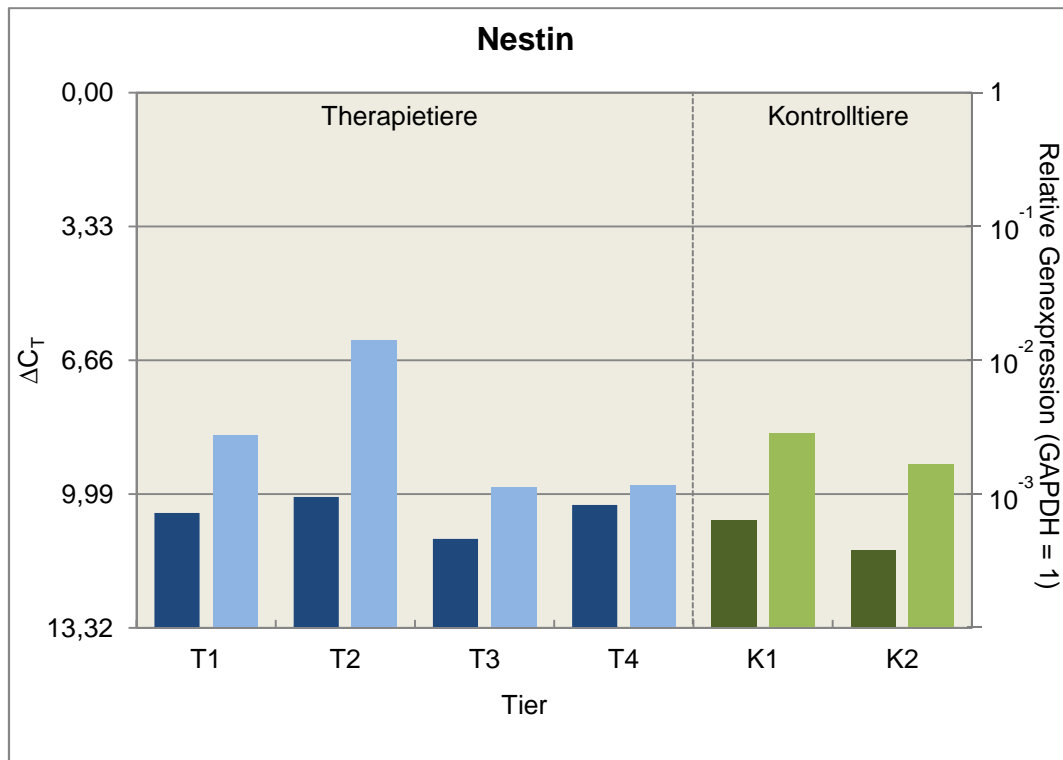


Abb. 4: Graphische Darstellung der Nestin-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Die mRNA-Expression von Nestin ist sowohl bei den Therapietieren als auch bei den Kontrolltieren im Tumorgewebe deutlich erhöht und scheint nicht temozolomidsensitiv zu sein.

Exemplarisch sei dies anhand der mRNA-Expressionswerte von CXCR4 des Therapietieres T3 und des Kontrolltieres K2 erläutert. Bei Tier T3 lag der ΔC_t -Wert des gesunden Gewebes bei 9,48. Der ΔC_t -Wert des tumorös veränderten Gewebes betrug 7,32. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert lag bei 4,47, was bedeutet, dass die mRNA-Expression von CXCR4 im erkrankten Gewebe im Vergleich zum gesunden Hirngewebe bei T3 um das fast 4,5-fache erhöht war. Bei Tier K2 lag der ΔC_t -Wert im gesunden Gewebe bei 8,48 und im erkrankten bei 6,37. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert betrug 4,32. Auch hier war die Expression im erkrankten Gewebe um das 4-fache gesteigert.

Für den Stammzellmarker Nestin betrachten wir die mRNA-Expressionwerte des Therapietieres T1 und des Kontrolltieres K2. Bei Tier T1 lag der ΔC_t -Wert im gesunden Gewebe bei 10,46, während der ΔC_t -Wert im tumorös veränderten Gewebe bei 8,52 lag. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert betrug somit 3,84. Das bedeutet, dass die mRNA-Expression von Nestin im erkrankten Gewebe im Vergleich zum gesunden Hirngewebe um das knapp 4-fache gesteigert war.

Bei Tier K2 lag der Δ CT-Wert im gesunden Gewebe bei 11,39. Im tumorös veränderten Gewebe betrug der Δ CT-Wert 9,25, was zu einem $\Delta\Delta$ CT-Wert von 4,41 führte. Die mRNA-Expression von Nestin war also auch bei dem Kontrolltier im erkrankten Gewebe um das 4-fache erhöht.

Generell war die mRNA-Mehrexpression von CXCR4 und Nestin im tumorösen Gewebe mindestens um den 0,83-fachen Wert erhöht und stieg bis auf das maximal 25,99-fache der im gesunden Gewebe exprimierten mRNA der beiden Marker an. Insgesamt lag die messbare mRNA-Expression von Nestin deutlich unter der mRNA-Expression von CXCR4 – ausgedrückt durch die generell höheren Δ CT-Werte für das Filamentprotein.

4.1.2.2. Gruppe B

In diese Gruppe gehören der Chemokinrezeptor CXCR7 und der Stammzellmarker Musashi-1. Hier zeigten sich sowohl bei den Therapietieren als auch bei den Kontrolltieren im Allgemeinen nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen gesundem und tumorös verändertem Gewebe. Die mRNA-Expression von CXCR7 und Musashi-1 scheint also wie auch in Gruppe A eher nicht temozolomidsensitiv, zudem scheint die Menge an CXCR7- und Musashi-1-mRNA in unserem Modell nur zu einem geringen Teil von einer malignen Entartung der Zellen abhängig zu sein.

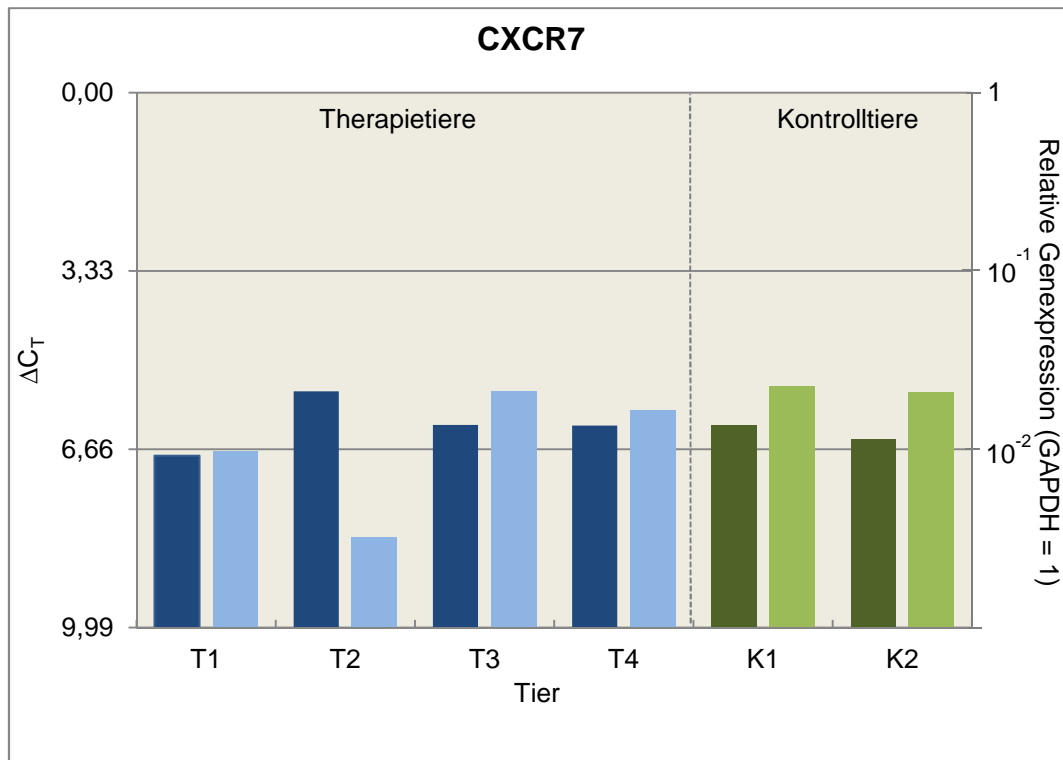


Abb. 5: Graphische Darstellung der CXCR7-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Es zeigen sich bei Therapie- und Kontrolltieren nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen gesundem und tumorös verändertem Gewebe. Eine Ausnahme scheint hier das Therapietier T2 zu sein. Im tumorös veränderten Gewebe tritt im Allgemeinen eine nur geringe Expressionssteigerung ein. Die mRNA-Expression von CXCR7 scheint temozolomidunabhängig und im Allgemeinen nur gering abhängig von einer malignen Entartung der Zellen zu sein.

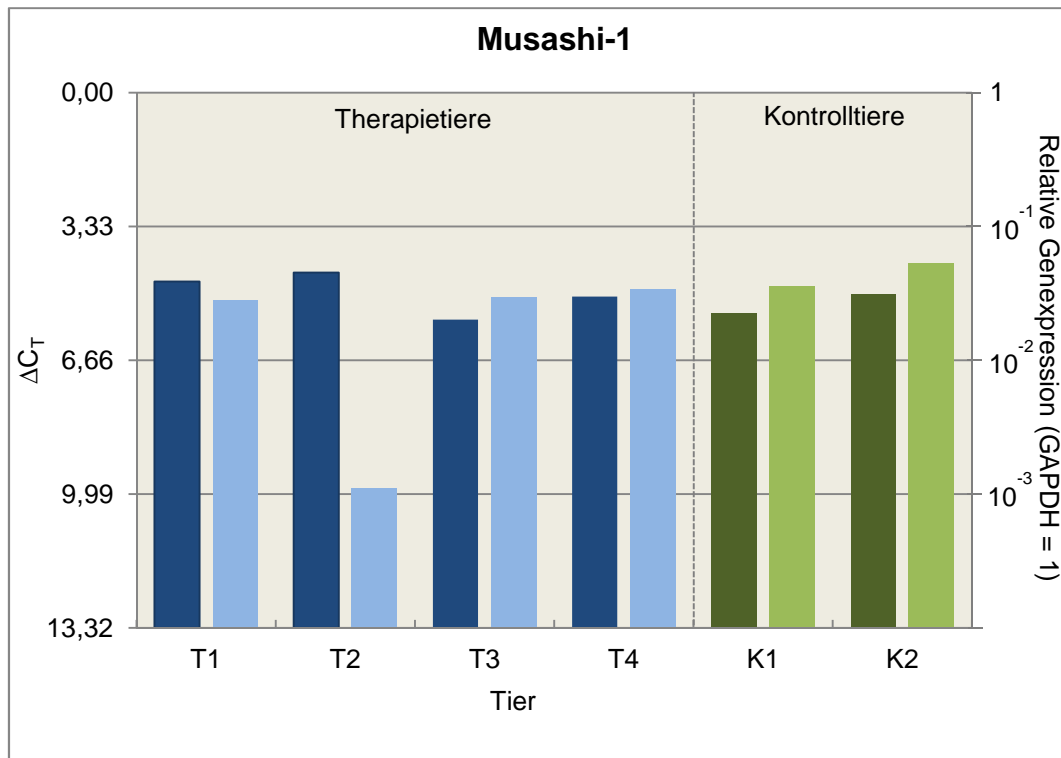


Abb. 6: Graphische Darstellung der Musashi-1-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Es zeigen sich bei Therapie- und Kontrolltieren nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen gesundem und tumorös verändertem Gewebe. Eine Ausnahme stellt hier das Therapietier T2 dar. Die mRNA-Expression von Musashi-1 scheint insgesamt betrachtet nicht temozolomidsensitiv zu sein und nur gering abhängig von einer malignen Entartung der Zellen.

Erläutert sei dies anhand der mRNA-Expressionswerte von CXCR7 des Therapietieres T3 und des Kontrolltieres K1.

Im gesunden Gewebe betrug der ΔCT -Wert von T3 6,21, im erkrankten Gewebe lag er bei 5,58. Der $\Delta\Delta CT$ -Wert war 1,54. Tier K1 hatte im gesunden Gewebe ebenfalls einen ΔCT -Wert von 6,21, im erkrankten von 5,50, womit der $\Delta\Delta CT$ -Wert 1,65 betrug. In beiden Fällen war also die mRNA-Expression von CXCR7 im erkrankten Gewebe nur um das etwa 1,5-fache gesteigert.

Für den Stammzellmarker Musashi-1 betrachten wir exemplarisch ebenfalls das Therapietier T3, sowie das Kontrolltier K1.

Im gesunden Gewebe lag der ΔCT -Wert von T3 bei 5,65. Im erkrankten Gewebe betrug der ΔCT -Wert 5,09. Damit lag der $\Delta\Delta CT$ -Wert bei 1,47. Kontrolltier K1 wies im gesunden Gewebe einen ΔCT -Wert von 5,49 auf. Der ΔCT -Wert des erkrankten

Gewebes lag bei 4,81. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert belief sich auf 1,60. Sowohl Therapietier als auch Kontrolltier wiesen also im erkrankten Gewebe nur eine um das etwa 1,5-fach gesteigerte mRNA-Expression auf.

Kurz erwähnt sei Therapietier T2, welches deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen gesundem und erkranktem Gewebe aufwies und somit eine Ausnahme im Expressionsmuster von CXCR7 und Musashi-1 in unserem Modell darstellte.

Die mRNA-Expression von CXCR7 und Musashi-1 im Tumorgewebe bei Therapie- und Kontrolltieren ist, verglichen mit dem gesunden Gewebe, insgesamt nur um das 0,71-fache erniedrigt beziehungsweise um das 1,83-fache erhöht.

Insgesamt betrachtet liegt die mRNA-Expression von Musashi-1 nur geringfügig über der mRNA-Expression von CXCR7 – ausgedrückt durch nahezu gleiche ΔCT -Werte.

4.1.2.3. Gruppe C

In diese Gruppe lassen sich der Chemokinligand CXCL12 sowie die Stammzellmarker CD133 und SOX-2 zusammenfassen.

Diese Gruppe zeichnet sich dadurch aus, dass sich die mRNA-Expression von gesundem und tumorösem Hirngewebe bei den Therapietieren im Allgemeinen nur geringfügig unterschied, während es bei der mRNA-Expression von gesundem und erkranktem Gewebe bei den Kontrolltieren deutlichere Unterschiede gab.

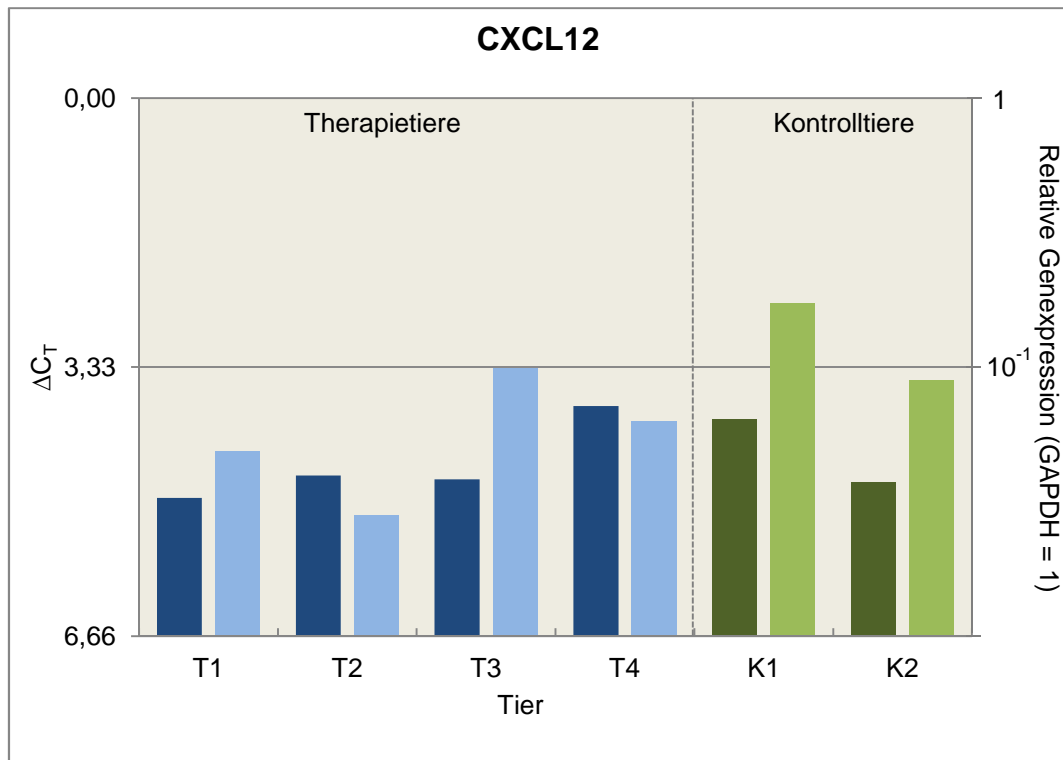


Abb. 7: Graphische Darstellung der CXCL12-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Es zeigen sich mit Ausnahme des Therapietieres T3 nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression von CXCL12 zwischen gesundem Hirn und Tumor bei den Therapietieren. Bei den Kontrolltieren zeigen sich deutlichere Abweichungen in der mRNA-Expression von CXCL12 zwischen gesundem Hirn und Tumor. Die mRNA-Expression von CXCL12 scheint somit temozolomidsensitiv zu sein.

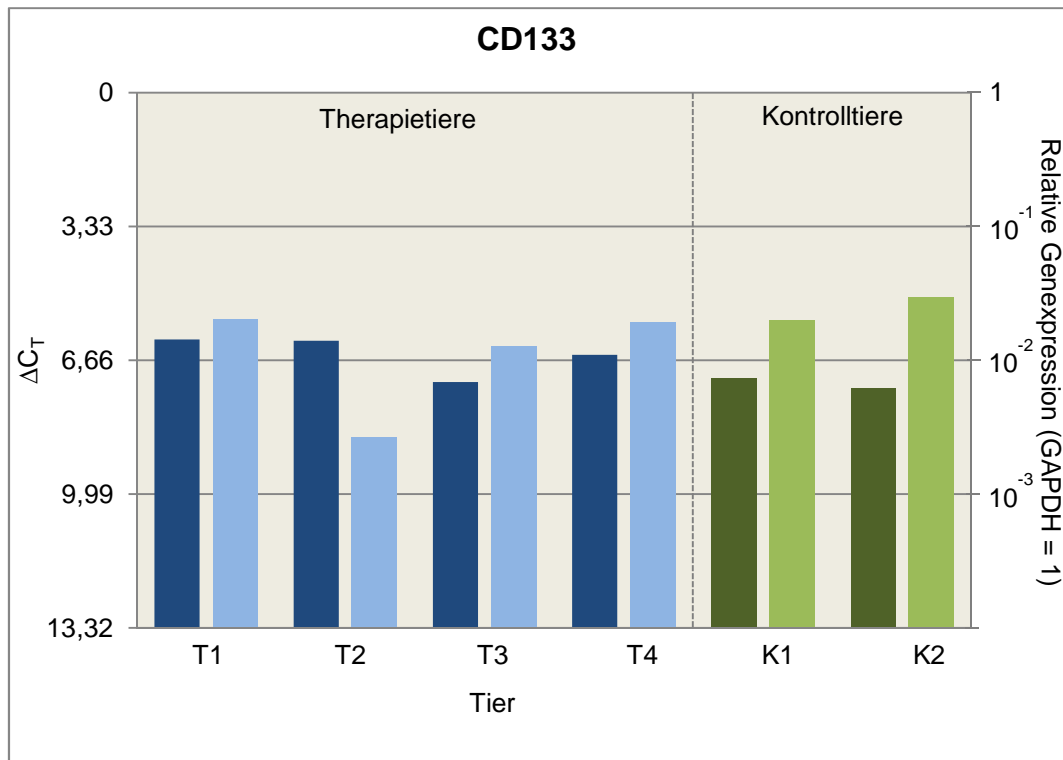


Abb. 8: Graphische Darstellung der CD133-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Es zeigen sich nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression von CD133 zwischen gesundem Hirn und Tumor bei den Therapietieren. Eine Ausnahme stellt hier das Therapietier T2 dar. Bei den Kontrolltieren zeigen sich deutlichere Abweichungen in der mRNA-Expression von CD133 zwischen gesundem Hirn und Tumor. Die CD133 mRNA-Expression scheint somit temozolomidsensitiv zu sein.

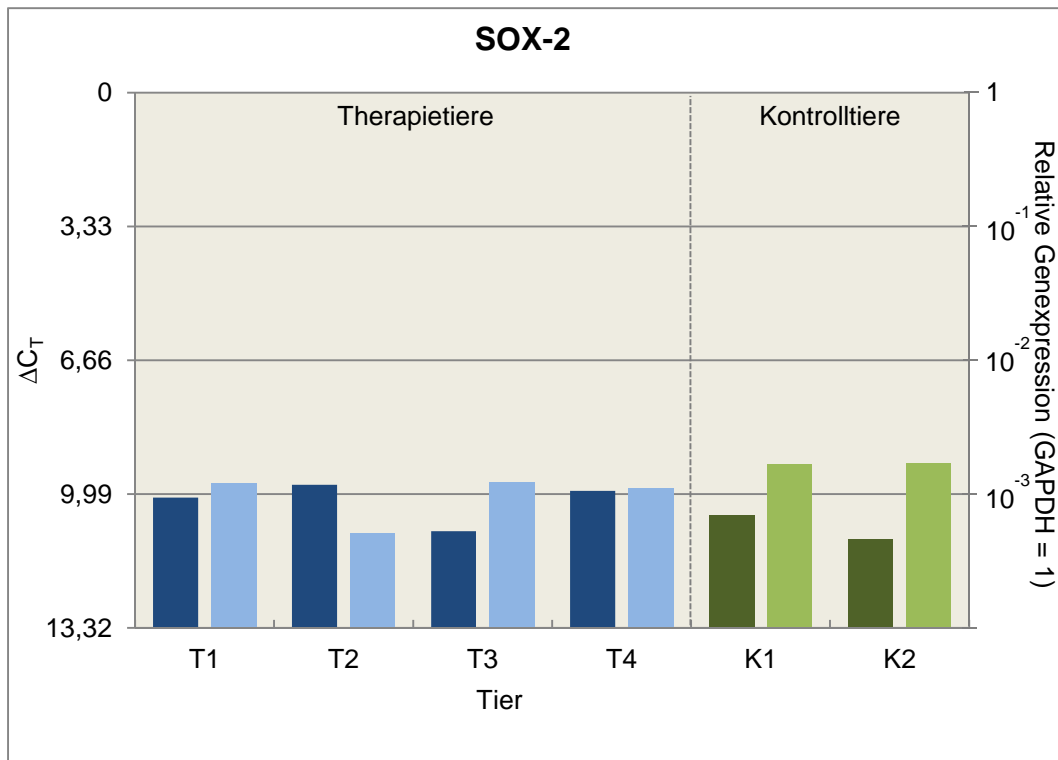


Abb. 9: Graphische Darstellung der SOX-2-Expression bei Therapietieren (T1-T4) und Kontrolltieren (K1, K2), jeweils im gesunden Hirngewebe (dunkle Balken) und im Tumorgewebe (helle Balken).

Es zeigen sich nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression von SOX-2 zwischen gesundem Hirn und Tumor bei den Therapietieren. Bei den Kontrolltieren zeigen sich deutlichere Abweichungen in der mRNA-Expression von SOX-2 zwischen gesundem Hirn und Tumor. Die mRNA-Expression von SOX-2 scheint somit temozolomidsensitiv zu sein.

Beispielhaft sei dies an den mRNA-Expressionswerten von CXCL12 bei Therapietier T1 und Kontrolltier K1 erläutert. T1 hatte im gesunden Gewebe einen ΔC_T -Wert 4,95. Im Tumorgewebe lag der ΔC_T -Wert bei 4,37. Daraus ließ sich ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1,50 ermitteln. Kontrolltier K1 hingegen wies im gesunden Hirngewebe einen ΔC_T -Wert 3,97 auf. Der ΔC_T -Wert des erkrankten Gewebes lag bei 2,54. Hier betrug der $\Delta\Delta C_T$ -Wert 2,70.

Die mRNA-Expression von CD133 sei ebenfalls anhand von Therapietier T1 und Kontrolltier K1 erläutert. T1 hatte im gesunden Gewebe einen ΔC_T -Wert 6,14 und im Tumorgewebe einen ΔC_T -Wert von 5,63. Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert betrug hier nur 1,42. Tier K1 hingegen wies im gesunden Gewebe einen ΔC_T -Wert 7,12 und im erkrankten Gewebe einen ΔC_T -Wert von 5,67 auf, woraus sich ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 2,73 ergab. Eine Ausnahme im mRNA-Expressionsverhalten von CD133 stellte auch hier erneut

Therapietier T2 dar, wo es, verglichen mit den Therapietieren T1, T3 und T4, zu einer deutlichen Divergenz in der mRNA-Expression zwischen gesundem und erkranktem Hirngewebe kam.

Zuletzt sei die mRNA-Expression von SOX-2 ebenfalls exemplarisch anhand von Therapietier T1 und Kontrolltier K1 erläutert. Im gesunden Gewebe lag der Δ CT-Wert von T1 bei 10,08. Im erkrankten Gewebe betrug der Δ CT-Wert 9,72. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert lag bei 1,28. Bei Kontrolltier K1 hingegen betrug der Δ CT-Wert des gesunden Hirngewebes 10,51 und der Δ CT-Wert des erkrankten Gewebes lag bei 9,24. Daraus ergab sich ein $\Delta\Delta$ CT-Wert von 2,41.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass die mRNA-Expression von CXCL12, CD133 und SOX-2 bei allen Therapietieren, verglichen mit dem gesunden Gewebe, im erkrankten Gewebe nur um das 0,43- bis maximal 2,58-fache ansteigt. Bei den Kontrolltieren hingegen liegt diese Mehrexpression der mRNA im Tumorgewebe bei den 2,39- bis 4,82-fachen Werten gegenüber dem gesunden Hirngewebe.

In dieser Gruppe scheint also die mRNA-Expression von CXCL12, CD133 und SOX-2 in C6-Gliomen erhöht zu sein – ausgedrückt durch die generell geringeren Δ CT-Werte der Marker. Außerdem wird deutlich, dass diese Marker temozolomidsensitiv reagieren, indem es bei Gabe von Temozolomid im gesunden Gewebe zu einer vermehrten Expression dieser Marker kommt – verdeutlicht durch die geringeren $\Delta\Delta$ CT-Werte bei den Therapietieren, verglichen mit den Kontrolltieren.

Abschließend muss festgestellt werden, dass die mRNA-Expression von SOX-2 deutlich geringer ist als die mRNA-Expression von CXCL12 und CD133. Verdeutlicht wird das durch die hohen Δ CT-Werte, die für die Expression der mRNA von SOX-2 ermittelt wurden. Diese liegen im Bereich zwischen 9,24 – 11,11. Die Δ CT-Werte der mRNA-Expression von CD133 und CXCL12 liegen hingegen im Bereich von 3,50 – 7,37.

4.2. Ergebnisse des Versuchsabschnittes *in vitro*

4.2.1. Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in unstimulierten, mit Temozolomid stimulierten und mit DMSO behandelten C6-Zellen

Um genauer untersuchen zu können, welchen Effekt das Chemotherapeutikum Temodal® auf die C6-Tumorzellen hat, wurden diese im folgenden Versuchsabschnitt isoliert *in vitro* betrachtet.

In dem dreiarmligen Versuchsaufbau (siehe 3.2.1.) blieben die C6-Zellen im ersten Arm unstimuliert, im Zweiten erfolgte die Zugabe von 0,1% DMSO, der dritte Arm wurde mit 20µg/ml Temozolomid stimuliert. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt.

Anschließend wurde mittels DNA-Verdau, cDNA-Synthese durch Reverse Transkription mit anschließender Real-Time PCR die mRNA-Expression von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 für jeden Versuchsarm ermittelt. Diese wird durch den Δ CT-Wert ausgedrückt, der wie unter 4.1.1. beschrieben zu interpretieren ist.

Die Mehrexpression nach Temozolomidstimulus errechnete sich aus dem Δ CT-Wert der mit DMSO 0,1% behandelten C6-Zellen und dem Δ CT-Wert der mit Temozolomid behandelten C6-Zellen. Sie wird als $\Delta\Delta$ CT-Wert ausgedrückt. Da Temozolomid zur Therapie in DMSO gelöst wird, muss folgerichtig die Mehrexpression zwischen diesen beiden Werten ermittelt werden, um die rein durch Temozolomid verursachte Expressionssteigerung ablesen zu können. Würde die Mehrexpression zwischen den Δ CT-Werten der unstimulierten C6-Zellen und den mit Temozolomid behandelten C6-Zellen errechnet, ließe sich nicht mit Sicherheit sagen, ob die Mehrexpression durch Temozolomid entstanden ist, oder durch das DMSO, in welchem es gelöst wurde.

Die folgende Abbildung stellt die Mehrexpression nach Temozolomidgabe als Mittelwert (MW) der $\Delta\Delta$ CT-Werte der drei Versuchsdurchläufe mit jeweiliger Standardabweichung (SD) graphisch dar.

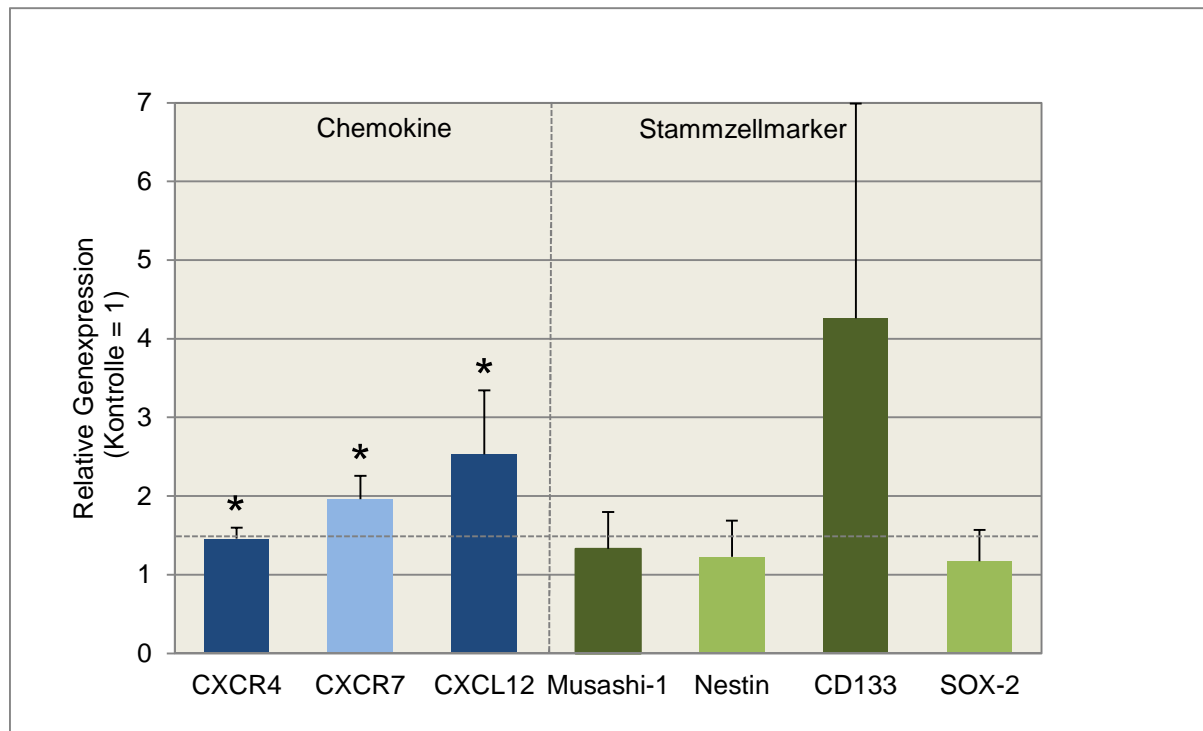


Abb. 10: Graphische Darstellung der Mehrexpression unter Temozolomidstimulus.

Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert einschließlich Standardabweichung. $p < 0,05$: *. Cut off bei Expressionsinduktion von 1,5.

Es geht aus Abbildung 10 hervor, dass die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und der Chemokinligand CXCL12 alle unter den gewählten *in vitro* Bedingungen auf den Stimulus mit Temozolomid mit einer statistisch signifikanten ($p < 0,05$: *) Expressionssteigerung um den mindestens 1,5-fachen Wert reagierten, während alle Stammzellmarker unter dem statistisch signifikanten Cut off von 1,5 verblieben und somit als nicht temozolomidsensitiv einzustufen sind. Unter Vorbehalt ist hier die Expressionssteigerung von CD133 zu interpretieren, da die Messungen aufgrund der eher geringen Expression dieses Markers am Detektionslimit lagen.

4.2.2. Proliferationsverhalten von C6-Zellen

Dieser Versuch untersuchte das Proliferationsverhalten von C6-Zellen (siehe 3.2.2.) in acht verschiedenen Ansätzen. Die Zellen blieben im ersten Versuchsaarm unstimuliert und erhielten in den weiteren sieben Armen einen Stimulus mit Temozolomid in verschiedenen Konzentrationen, SDF-1 1nM und/oder DMSO 1%, jeweils in unterschiedlicher Kombination. Jeder Stimulus erfolgte dabei auf drei unabhängigen 6-well-Platten. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Ansätze

aufbereitet. Mit Hilfe des Fluoreszenzphotometers wurde die Extinktion der Zelllysate ermittelt, woraus sich wiederum die Menge der DNA berechnen ließ.

Die folgende Abbildung stellt das Proliferationsverhalten der C6-Zellen graphisch dar.

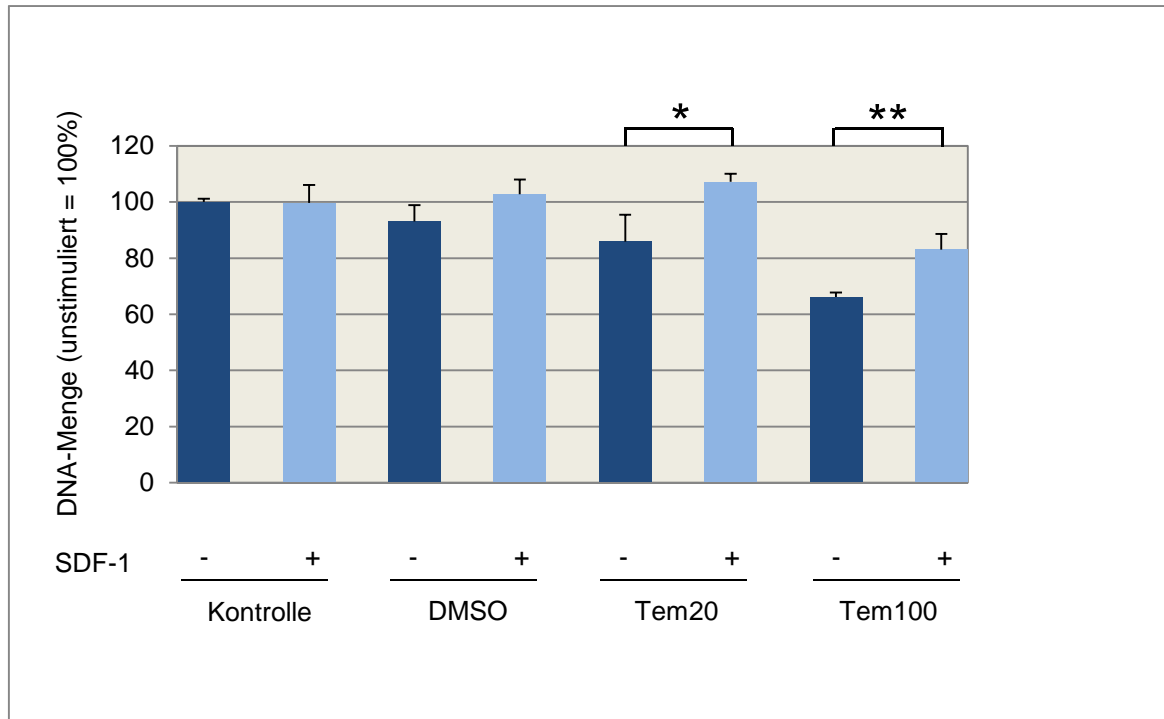


Abb. 11: Graphische beispielhafte Darstellung des Proliferationsverhaltens von C6-Zellen.

Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. $p > 0,05$: * und $p < 0,01$: **. Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: SDF-1 1nM (SDF-1), Dimethylsulfoxid 1% (DMSO), Temozolomid 20µg/ml (Tem20), Temozolomid 100µg/ml (Tem100).

Der Mittelwert der Proliferationsrate unstimulierter C6-Zellen betrug in diesem Versuch 100% mit einer Standardabweichung von 1,2%. Die Zugabe von SDF-1 1nM hatte auf das Proliferationsverhalten nahezu keinen Effekt. Der Mittelwert lag weiterhin bei 99,7% \pm 6,4% Standardabweichung.

Mit DMSO 1% stimulierte C6-Zellen zeigten einen leichten, allerdings statistisch nicht signifikanten und somit im Rahmen der Meßschwankungen angesiedelten Rückgang der Proliferation. Der Mittelwert betrug 93,1% \pm 5,8% Standardabweichung. Dieser Rückgang konnte durch die zusätzliche Gabe von SDF-1 1nM aufgehoben werden und die Proliferation stieg auf einen Mittelwert von 102,8% \pm 5,2% Standardabweichung.

Unter Temozolomidstimulus mit einer Konzentration von 20µg/ml (Tem20) ging die Proliferation auf einen Mittelwert von 85,9 % \pm 9,6% Standardabweichung zurück. Hier führte die zusätzliche Gabe von SDF-1 1nM zu einer Gegenregulation und die

Proliferation stieg auf einen Mittelwert von $107,2\% \pm 2,8\%$ Standardabweichung an. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p > 0,05$: *).

Erhöhte man die Temozolomidkonzentration auf $100\mu\text{g/ml}$ (Tem100), sank die Proliferation der C6-Zellen weiter ab und lag bei einem Mittelwert von $66,1\% \pm 1,6\%$ Standardabweichung. Die zusätzliche Gabe von SDF-1 1nM erhöhte die Proliferation, sodass der Mittelwert bei $83\% \pm 5,6\%$ Standardabweichung lag. Die Unterschiede waren hier statistisch sehr signifikant ($p < 0,01$: **).

Es wird also deutlich, dass Temozolomid die Proliferation von C6-Zellen dosisabhängig reduziert. Bei gleichzeitiger Stimulation mit SDF-1 kann dieser Effekt bei niedrigen Konzentrationen vollständig, bei höheren Temozolomidkonzentrationen deutlich reduziert werden.

4.2.3. Apoptoseverhalten von C6-Zellen

Der Versuch zum Apoptoseverhalten der C6-Zellen (siehe 3.2.3.) bestand aus zwei Versuchsabschnitten. Der erste Versuchsabschnitt setzte sich aus fünf Therapiearmen zusammen und untersuchte die Auswirkungen verschiedener Temozolomidkonzentrationen auf die C6-Zellen. Der zweite Versuchsabschnitt bestand aus acht Therapiearmen und untersuchte die Effekte von Temozolomid in Kombination mit SDF-1 1nM und CCX733 100nM auf die C6-Zellen. Nach Beendigung der Stimulation wurden die verschiedenen Ansätze aufbereitet und mittels Nicoletti-Staining angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden pro Deckglas sechs Gesichtsfelder ausgezählt.

Die folgende Abbildung stellt die graphische Auswertung des ersten Versuchsabschnittes dar. Dargestellt sind außerdem die Kerne der C6-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der apoptotischen Kerne unter Temozolomidtherapie deutlich zunimmt. Die durch das sogenannte „blebbing“ abgeschnürten Vesikel und die geschrumpften Zellkörper der apoptotischen C6-Zellen imponieren durch stärkere Fluoreszenz und abnorme Zellkernstrukturen. Die Zellanzahl ist, verglichen mit dem DMSO 2%-Stimulus, deutlich verringert.

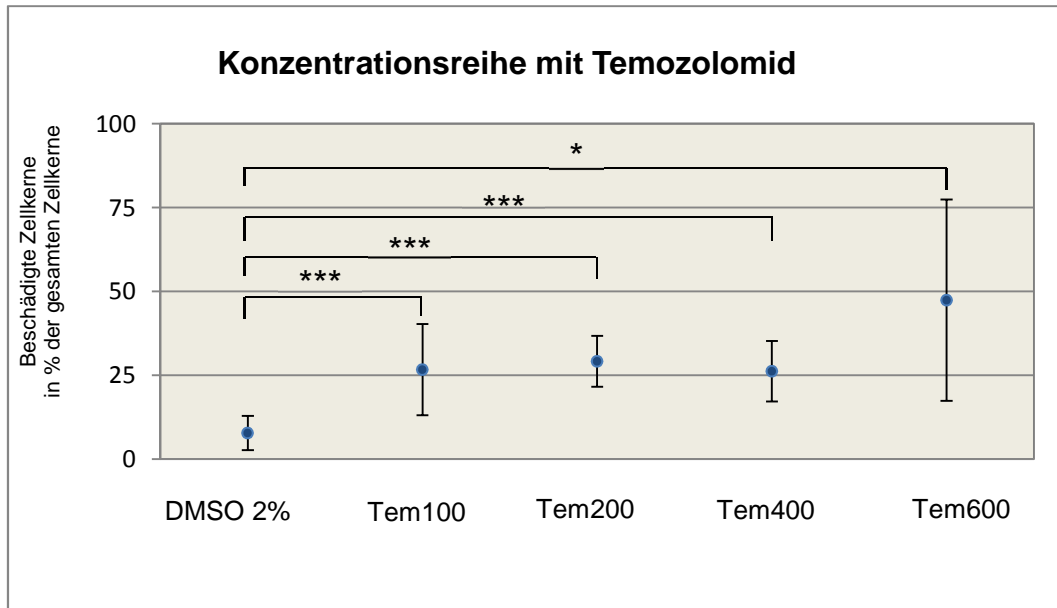


Abb. 12: Graphische Darstellung des apoptotischen Effektes von Temozolomid auf C6-Zellen.

Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung für jeden Therapiearm. $p > 0,05$: * und $p < 0,001$: ***. Die Stimuli der Therapiearme werden wie folgt abgekürzt: Dimethylsulfoxid 2% (DMSO 2%), Temozolomid 100µg/ml (Tem100), Temozolomid 200µg/ml (Tem200), Temozolomid 400µg/ml (Tem400), Temozolomid 600µg/ml (Tem600).

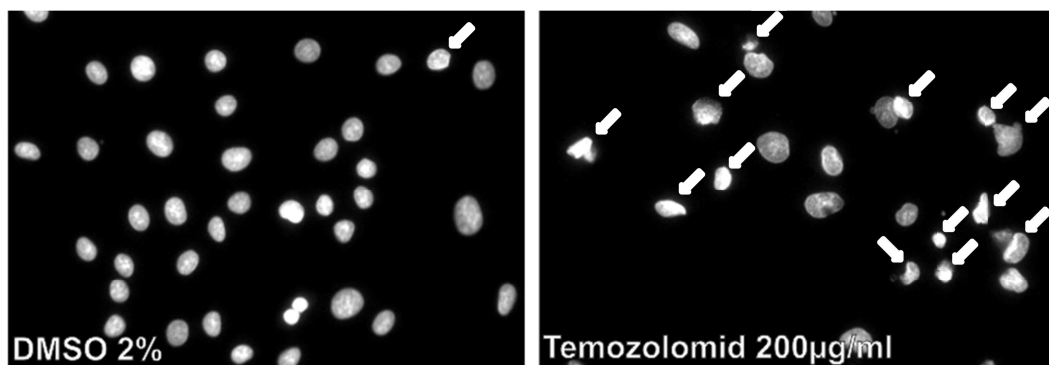


Abb. 13: Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Das linke Bild zeigt die Zellkerne der C6-Zellen unter dem Einfluss von Dimethylsulfoxid 2% (DMSO 2%). Es sind kaum beschädigte Zellkerne zu sehen. Auf dem rechten Bild wird der apoptotische Effekt von Temozolomid 200µg/ml auf die Zellkerne der C6-Zellen sichtbar. Es sind insgesamt weniger Zellkerne sichtbar, wovon deutlich mehr deformierte, stärker fluoreszierende Zellkerne erkennbar sind. Hinweis: Apoptotische Zellkerne sind durch Pfeile markiert.

Unter Zugabe von DMSO 2% lag der Mittelwert der beschädigten Zellkerne bei 7,8% \pm 5,1% Standardabweichung.

Unter dem Stimulus von Temozolomid 100µg/ml (Tem100) stieg die Zahl der beschädigten Zellkerne auf einen Mittelwert 26,7% \pm 13,6% Standardabweichung an. Durch die Verdoppelung der Temozolomidkonzentration auf 200µg/ml (Tem200)

stieg die Zahl der beschädigten Zellkerne auf einen Mittelwert von $29,2\% \pm 7,6\%$ Standardabweichung. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf $400\mu\text{g/ml}$ Temozolomid (Tem400) brachte keinen erhöhten Apoptoseeffekt. Die Zahl der beschädigten Zellkerne lag bei einem Mittelwert von $26,2\% \pm 9\%$ Standardabweichung. Bei einem Stimulus mit Temozolomid $600\mu\text{g/ml}$ (Tem600) stieg die Apoptoserate auf einen Mittelwert von $47,7\% \pm 30\%$ Standardabweichung. Die Unterschiede im Apoptoseverhalten der C6-Zellen, die unter Temozolomid $100\mu\text{g/ml}$, $200\mu\text{g/ml}$ und $400\mu\text{g/ml}$ verglichen mit DMSO 2% sichtbar wurden, sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$: ***). Der Unterschied, der sich zwischen DMSO 2% und Temozolomid $600\mu\text{g/ml}$ ergab, war statistisch signifikant ($p > 0,05$: *).

Es lässt sich erkennen, dass der apoptotische Effekt von Temozolomid auf C6-Zellen dosisabhängig ansteigt.

Die Ergebnisse des zweiten Versuchsabschnittes werden durch nachstehendes Diagramm dargestellt.

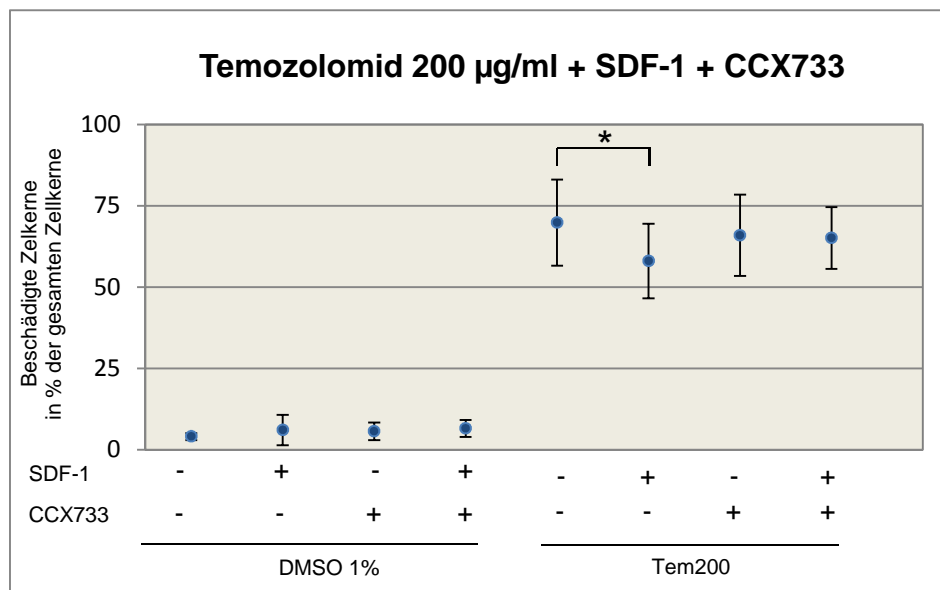


Abb. 14: Graphische Darstellung des apoptotischen Effektes von Temozolomid $200\mu\text{g/ml}$, SDF-1 und CCX733 auf C6-Zellen.

Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der Therapiearme mit Standardabweichungen. $p > 0,05$: *.

Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: SDF-1 1nM (SDF-1), CCX733 100nM (CCX733),

Dimethylsulfoxid 1% (DMSO 1%), Temozolomid $200\mu\text{g/ml}$ (Tem200).

Durch Zugabe von DMSO 1% zu den C6-Zellen kam es zu einer Apoptoserate, die bei einem Mittelwert von $4\% \pm 1,1\%$ Standardabweichung lag. Durch Zugabe von DMSO 1% und SDF-1 1nM lag die Zellkernsterblichkeit bei einem Mittelwert von 6%

$\pm 4,7\%$ Standardabweichung. Beim dritten Arm lag der Anteil der beschädigten Zellkerne unter Therapie mit DMSO 1% und CCX733 100nM bei einem Mittelwert von $5,6\% \pm 2,7\%$ Standardabweichung. Der vierte Arm erreichte durch die Kombination von DMSO 1%, SDF-1 1nM und CCX733 100nM eine Apoptoserate die bei einem Mittelwert von $6,5\% \pm 2,6\%$ Standardabweichung lag.

Da die Gabe von DMSO kaum einen apoptotischen Effekt auf die C6-Zellen hat, tritt auch durch die Zugabe von zusätzlichem SDF-1 kein Rettungseffekt bzw. kein aufhebender Effekt durch die Zugabe von CCX733 ein. Die vier ersten Werte der Graphik können daher als natürlicher Schwankungsbereich der Zellsterblichkeit von mit DMSO behandelten C6-Zellen angesehen werden.

Durch die Zugabe von Temozolomid 200 μ g/ml (Tem200) stieg der Anteil der apoptotischen Zellkerne erwartungsgemäß an und lag bei einem Mittelwert von $69,8\% \pm 13,2\%$ Standardabweichung. Bei gemeinsamer Verabreichung von Temozolomid 200 μ g/ml und SDF-1 1nM lag die Anzahl der beschädigten Zellkerne bei einem Mittelwert von $58\% \pm 11,5\%$ Standardabweichung. Das SDF-1 1nM zeigte hier also einen gegenregulierenden Effekt. Der Unterschied zur vorhergegangenen reinen Temozolomidgabe war statistisch signifikant ($p > 0,05$: *). Temozolomid 200 μ g/ml in Kombination mit CCX733 100nM erreichte eine Apoptoserate die bei einem Mittelwert von $65,9\% \pm 12,5\%$ Standardabweichung lag. CCX733 100nM reduziert hier den antiapoptotischen Effekt von CXCL12 und führt zusammen mit Temozolomid zu einer erhöhten Apoptoserate. Der achte Arm kombinierte Temozolomid 200 μ g/ml, SDF-1 1nM und CCX733 100nM. Durch Überlagerung des zellrettenden Effektes von CXCL12 und des aufhebenden Effektes von CCX733 100nM lag die Zellsterblichkeit, ähnlich wie bei alleinigem Temozolomidstimulus, bei einem Mittelwert von $65,1\% \pm 9,5\%$ Standardabweichung.

5. Diskussion

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste und auch der bösartigste primäre Hirntumor (Dresemann 2010). Die derzeitige Therapie der Wahl besteht aus der möglichst radikalen Tumorresektion. Dem schließt sich eine Strahlentherapie mit konkomitanter Chemotherapie mit dem Blut-Hirnschranken-gängigen Alkylans Temozolomid (Temodal®) nach dem 2005 von Stupp veröffentlichten Schema an (Stupp et al. 2005).

Trotz aller Fortschritte bei operativen Verfahren und adjuvanten Therapien ist die Prognose für einen an einem Glioblastoma multiforme erkrankten Patienten mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate unter 5% immer noch sehr schlecht (Stupp et al. 2009). Einer der Hauptgründe für diese schlechte Prognose liegt im Verbleib einzelner, ins umliegende Gewebe infiltrierter Tumorzellen. Bei diesen Zellen könnte es sich um tumorale Stammzellen handeln. Sie sprechen nicht auf Radiatio- oder Chemotherapie an, können nach einiger Zeit wieder in den Zellzyklus eintreten und führen so zu einem Rezidiv (Gilbert et Ross 2009).

Des Weiteren ist bekannt, dass Chemokine/Chemokinrezeptoren nicht nur im gesunden Nervensystem, sondern auch unter pathologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle spielen. Sie beeinflussen Parameter der Tumorgenese wie Tumorzellproliferation, Angiogenese und Metastasierung (Held-Feindt et al. 2008).

Um Stammzellpopulationen innerhalb eines Tumors nachweisen zu können, bedient man sich Stammzellmarkern und Chemokinen/Chemokinrezeptoren. Es ist daher von grundlegender Bedeutung, die Rolle dieser Marker besser zu erforschen, um die Therapie des Glioblastoma multiforme weiter zu verbessern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie das Glioblastoma multiforme im Hinblick auf die Expression und funktionelle Bedeutung von Chemokinen sowie verschiedenen Stammzellmarkern unter der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid reagiert.

Im Rahmen des tierexperimentellen Abschnittes konnten in Hirnparenchymproben mittels Real-Time PCR die Chemokinliganden/-Rezeptoren CXCL12, CXCR4 und CXCR7 nachgewiesen werden. Außerdem ließen sich die Stammzellmarker CD133, Nestin, Musashi-1 und SOX-2 nachweisen. Die Gewebeproben wurden Wistar-

Ratten jeweils aus der gesunden Hirnhemisphäre und aus der durch C6-Zellen tumorös veränderten Hemisphäre entnommen.

Innerhalb dieser Chemokine/Stammzellmarker konnte im Hinblick auf deren Expressionsmuster und der Temozolomidsensitivität eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen werden.

In der ersten Gruppe, bestehend aus CXCR4 und Nestin, fanden sich deutliche Unterschiede der mRNA-Expression zwischen gesundem und erkranktem Hirngewebe, unabhängig von der Temozolomidtherapie. In der zweiten Gruppe, die aus CXCR7 und Musashi-1 bestand, fanden sich im Allgemeinen nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen gesundem Hirngewebe und Tumor, ebenfalls unabhängig von der Gabe von Temozolomid. Die dritte Gruppe wurde aus CXCL12, CD133 und SOX-2 gebildet. Hier fanden sich im Allgemeinen nur geringe Unterschiede in der mRNA-Expression bei den Therapietieren, jedoch deutlichere Unterschiede der mRNA-Expression bei den Kontrolltieren.

In einer von Ma et al. 2008 durchgeführten Studie wurde ebenfalls die mRNA-Expression von verschiedenen Stammzellmarkern und Chemokinen mittels Real-Time PCR ermittelt. Man verglich dabei die mRNA-Expression der Chemokine und Stammzellmarker von 72 Astrozytomen verschiedener WHO-Klassifikation mit der von gesundem humanen Hirngewebe. Es konnten im Rahmen dieser Untersuchung die Stammzellmarker Nestin, CD133, SOX-2 und Musashi-1 nachgewiesen werden, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Des Weiteren wies die von Ma et al. durchgeführte Untersuchung ebenfalls den Chemokinrezeptor CXCR4 nach, welchen auch wir ermitteln konnten. Ma et al. beschrieben in ihrer Studie eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression aller Marker in den Astrozytomproben, verglichen mit dem gesunden humanen Hirngewebe. Dabei korrelierte die Menge der nachgewiesenen mRNA-Mengen von Nestin, CD133, SOX-2 und Musashi-1 mit dem WHO-Grad des Astrozytoms.

Unabhängig von der Gruppeneinteilung hinsichtlich der Temozolomidsensibilität konnte in der vorliegenden Arbeit, korrelierend zu den von Ma et al. beschriebenen Ergebnissen, ebenfalls eine allgemeine Erhöhung der mRNA-Expression von Chemokinen und Stammzellmarkern innerhalb der C6-Gliome festgestellt werden.

In vorangegangenen Studien werden unsere Ergebnisse bestätigt. Es konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von CXCR4 und SDF-1 im Glioblastoma multiforme festgestellt werden (Zagzag et al. 2006, do Carmo et al. 2010). Der

funktionelle Rezeptor CXCR7, der mit hoher Affinität an CXCL12 bindet, wird unter Hypoxie, wie sie beim schnell wachsenden Glioblastoma multiforme auftritt, hochreguliert (Schutyser et al. 2007). Die Expression von Nestin, Musashi-1 und SOX-2 korreliert im Glioblastoma multiforme mit dem Grad der Tumormalignität (Ma et al. 2008). Auch die Expression von CD133 ist in diesem Tumor deutlich erhöht (Ma et al. 2008; Thon et al. 2010) und korreliert mit der Überlebensrate der Patienten (Zeppernick et al. 2008). In Analogie dazu zeigte sich auch in unserem *in vivo*-Versuch eine deutliche Erhöhung der CD133-Expression bei den Therapie- und Kontrolltieren, was zu einem verminderten Ansprechen des Tumors auf das Chemotherapeutikum führt (Angelastro et al. 2010). Neue Studien geben allerdings Anlass zur Hoffnung, das Ansprechen des Glioblastoma multiforme auf die Chemotherapie mit Temozolomid verbessern zu können, indem die Signalwege zur Aktivierung von CD133 blockiert werden (Ulasov et al. 2011).

Um die Wirkweise von Temozolomid auf die C6-Zellen genauer untersuchen zu können, wurden diese im Anschluss isoliert *in vitro* betrachtet.

Unter Temozolomidstimulus zeigten die C6-Zellen eine statistisch signifikante Expressionssteigerung der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und des Chemokinliganden CXCL12, während die Expressionssteigerung aller ermittelten Stammzellmarker unter dem gesetzten Cut-off von 1,5 verblieb.

C6-Zellen exprimieren CXCR7 und CXCL12 auf einem gut nachweisbaren Niveau, während der Chemokinrezeptor CXCR4 in geringeren Mengen nachzuweisen ist. Temozolomid induziert sowohl die vermehrte Expression von CXCL12 als auch der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7. CXCR4 scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns zu spielen, insbesondere bei der Migration und dem Überleben von neuronalen und oligodendrogialen Vorläuferzellen (Dziembowska et al. 2005). CXCR7 ist am Reifeprozess von Gliazellen beteiligt (Göttle et al. 2010) und ist der dominante Rezeptor für CXCL12 im Rattenhirn (Schönemeier et al. 2008). CXCL12 und CXCR7 vermitteln einen Rettungseffekt bei humanen Glioblastomzellen und wirken der medikamentös induzierten Apoptose entgegen (Hattermann et al. 2010). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Aussage für C6-Gliome. Veranschaulicht wird dieser Mechanismus in der in unserem Versuchsaufbau besonders gesteigerten Expression von CXCL12 und CXCR7 unter Temozolomidstimulus.

Bei Tumoren, die resistent auf die adjuvant angewendete Chemotherapie mit Temozolomid reagieren, konnte seit einiger Zeit eine kleine Population von Zellen nachgewiesen werden, die dafür ursächlich sind. Beim Glioblastoma multiforme handelt es sich dabei um Glioblastomstammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Stammzellen nicht auf die Therapie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid ansprechen (Fu et al. 2009). Analog dazu lässt sich schlussfolgern, dass auch die entsprechenden Stammzellmarker auf einen chemischen Reiz durch Temozolomidgabe nicht mit einer Expressionssteigerung reagieren dürften. Diese Vermutung wird durch unsere Ergebnisse im *in vitro*-Abschnitt dieser Arbeit bestätigt. Die Expression der Stammzellmarker Musashi-1, Nestin, CD133 und SOX-2 stieg auch unter Temozolomidstimulus nicht statistisch signifikant an.

Während sich also im *in vivo*-Versuch die mRNA-Expression von CD133 und SOX-2 im gesunden Hirnparenchym temozolomidsensitiv veränderte, konnten wir im *in vitro*-Abschnitt keine Temozolomidsensitivität beobachten. Ein Grund für die gesteigerte Expression von CD133 und SOX-2 im gesunden Hirngewebe nach Temozolomidgabe mag in den Umgebungsfaktoren des Tierversuches begründet sein.

So induziert Temozolomid über die Aktivierung von p53 die Apoptose (Oliva et al. 2010). Das Tumorwachstum wird so gestoppt oder verlangsamt. Da das Glioblastoma multiforme schlecht auf die Chemotherapie anspricht (Daga et al. 2011), wird der Prozess des Tumorwachstums vorerst nur verlangsamt. Zusätzlich zu diesen Effekten könnten nun durch die Gabe von Temozolomid Substanzen im Hirnparenchym aktiviert werden. Diese führen dazu, dass Stammzellmarker andersartig reguliert werden und sich, wie unsere Versuchsergebnisse zeigen, im gesunden Hirnparenchym erhöhte Mengen mRNA von bestimmten Stammzellmarkern nachweisen lassen.

Somit ist aufgrund der Wechselwirkungen, die zwischen den Zellen des gesunden umliegenden Hirnparenchyms und den Tumorzellen entstehen können, eine direkte Vergleichbarkeit der *in vivo*-Ergebnisse mit den *in vitro*-Ergebnissen nicht ohne Weiteres möglich, obwohl die *in vivo*-Ergebnisse interessante Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen der untersuchten Chemokine/Stammzellmarker bieten.

Zudem kam zum Nachweis der Chemokine und Stammzellmarker, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, die Real-Time RT-PCR in unseren Versuchen zur Anwendung. Die Real-Time RT-PCR ist eine sensitive Methode, welche die Expression eines Gens mittels Echtzeit-PCR nachweist. Im Vergleich zur konventionellen RT-PCR kann bei der Real-Time RT-PCR eine genaue Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgen. Die hohe Sensitivität der Real-Time RT-PCR beinhaltet allerdings den Nachteil, dass bei einer ausreichenden Expression verschiedener Gene immer ein Signal gemessen wird. Dieses kann unter Umständen dazu führen, dass Unterschiede zwischen einzelnen Ansätzen nicht so ideal abgebildet werden können. Alternativ zur Real-Time PCR gibt es zum Nachweis bestimmter Marker des Weiteren die Möglichkeit, diese auf Proteinebene mittels qualitativer Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Der Western-Blot ist allerdings im Nachweisverfahren weniger empfindlich und die Detektierbarkeit eines Proteins ist stark abhängig von der Qualität des verwendeten Antikörpers. Die von uns gewonnenen Ergebnisse sind zudem quantitativ, was für unsere Fragestellung von grundlegender Bedeutung war. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen der von uns nachzuweisenden Chemokine und Stammzellmarker war die Verwendung der Western-Blot-Analyse zudem schwierig. Während die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 beispielsweise in der Zellmembran aufzufinden sind, ist SOX-2 im Zellkern nachzuweisen. Dieses hätte einen unterschiedlichen Aufschluss der Zellen vorausgesetzt (Zellmembranisolation versus Gesamtlusat) und somit zu Ungenauigkeiten geführt. CXCL12 wird zudem sofort von der Zelle sezerniert und ist daher nicht in der Zelle, sondern im Überschuss zu lokalisieren. Für CXCL12 käme somit keine Western-Blot-Analyse, sondern ein ELISA-Test (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zur Anwendung. Für unsere Fragestellung und dem damit verbundenen Versuchsaufbau war daher die Real-Time RT-PCR die Methode der Wahl.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Real-Time PCR die mRNA-Expression der Stammzellmarker Nestin, CD133, SOX-2 und Musashi-1 nachgewiesen. Dieses sind klassische Marker, die, wie auch in unserer Arbeit, zum Nachweis von Zellen mit stammzellartigen Qualitäten innerhalb von Glioblastomen herangezogen werden (Ma et al. 2008, Gilbert et Ross, 2009). Gemäß der Stammzelltheorie ist diese Zellpopulation durch ihre Eigenschaft zur Selbsterneuerung für die hohe

Therapieresistenz und hohe Rezidivrate des Glioblastoma multiforme verantwortlich (Rahman et al. 2011). Bei der Verwendung der oben genannten Marker als tumorale Stammzellmarker bleibt allerdings zu bedenken und muss kritisch mit in die Überlegungen einbezogen werden, dass sich einige der Marker ebenfalls auf benignen Zelloberflächen nachweisen lassen und damit nicht ausschließlich in der Tumorforschung Anwendung finden. So ist CD133 ein Oberflächenmarker für neuronale Stammzellen (Uchida et al. 2000) und wurde erstmals verwendet, um hämatopoetische Stammzellen nachweisen zu können (Miraglia et al. 1997). Andere Studien haben gezeigt, dass das Intermediärfilament Nestin bei Ratten nach einer Ischämie in erhöhtem Maße von reaktiven Astrozyten exprimiert wird (Pforte et al. 2005). Kürzlich konnte eine gesteigerte Nestin-Expression im Gehirn und Rückenmark von Mäusen als Reaktion auf eine periphere Nervschädigung nachgewiesen werden (Matsumura et al. 2010).

Auch im Beckenganglion der Ratte kam es nach cavernöser Nervläsion zur einer Hochregulation der Nestin-Expression (Kutlu et al. 2011). Es wird also deutlich, dass der auslösende Stimulus, der zu einer erhöhten Nestin-Expression führt, nicht ausschließlich malignen Ursprungs sein muss, auch wenn die verwendeten Marker nach gängiger Literatur anerkannte Stammzellmarker darstellen.

Ein weiterer Versuch der vorliegenden Arbeit betrachtete isoliert das Proliferationsverhalten von C6-Zellen unter der Zugabe von Temozolomid in verschiedenen Konzentrationen, SDF-1 und/oder DMSO 1%, jeweils in unterschiedlicher Kombination. Dabei stellte sich heraus, dass SDF-1 den antiproliferativen Effekt von Temozolomid bei geringer Dosierung vollständig und bei höherer Dosierung zum größten Teil aufhebt. Vermittelt wird dieser Rettungseffekt von SDF-1 durch den Rezeptor CXCR7 (Hattermann et al. 2010). Bisher beschriebene Beispiele für Effekte, die durch SDF-1 über den Rezeptor CXCR7 vermittelt werden, sind die Chemotaxis in T-Lymphozyten (Balabanian et al. 2005), die Angiogenese, Infiltration und das tumorale Wachstum von hepatocellulären Karzinomen (Zheng et al. 2010) sowie die Förderung des Tumorstwachstums verschiedener humaner Tumore *in vivo* (Burns et al. 2006; Miao et al. 2007).

Dass, wie unsere Ergebnisse zeigen, SDF-1 über den Rezeptor CXCR7 den antiproliferativen Effekt von Temozolomid aufheben beziehungsweise verringern kann, wurde in der Literatur durch Hattermann et al. 2010 beschrieben.

Um unsere Ergebnisse weiter zu verifizieren, analysierte der letzte Versuchsaufbau das Apoptoseverhalten von C6-Zellen unter der Zugabe von Temozolomid in verschiedenen Konzentrationen, sowie bei der Zugabe von Temozolomid in Kombination mit SDF-1 und CCX733.

Der Versuch ließ erkennen, dass der apoptotische Effekt von Temozolomid auf C6-Zellen dosisabhängig ansteigt. Wie erwartet zeigte die zusätzliche Gabe von Temozolomid und SDF-1 durch den antiapoptotischen Effekt einen Rückgang der Apoptoserate, während die Apoptoserate durch die Kombination von Temozolomid, SDF-1 und CCX733 wieder anstieg. Da CCX733 der selektive Antagonist von CXCR7 ist, bestätigt dieses Ergebnis die bereits im vorangegangenen Versuchsaufbau gewonnene Erkenntnis, dass der antiapoptische Effekt von SDF-1 über den Rezeptor CXCR7 vermittelt wird. Im humanen Glioblastoma multiforme verhindert dieser SDF-1/CXCR7-Mechanismus das Ansprechen der Tumorzellen auf die Chemotherapie (Hattermann et al. 2010). Für die Behandlung des Glioblastoma multiforme stellt diese Erkenntnis einen wichtigen Ansatz für neue Therapiemöglichkeiten dar und bedarf weitergehender Forschung.

Ähnliche Therapieansätze untersuchte eine Studie für den Pankreas- und Kolonkrebs. Das Medikament Celastrol nimmt hier Einfluss auf den CXCR4/CXCL12-Mechanismus und führt zu einer Herunterregulierung von CXCR4. Das wiederum führt dazu, dass die Invasivität der Tumorzellen unterdrückt wird, welche durch CXCL12, den Liganden von CXCR4, ausgelöst wird (Yadav et al. 2010).

Eine weitere Studie konnte ähnliche Entdeckungen in der Therapie von Brustkrebs machen. Es konnte eine erhöhte Expression von CXCR4 und des Cannabinoid-Rezeptors CB(2) nachgewiesen werden. Zwischen diesen beiden Rezeptoren scheint es zu einer Interaktion zu kommen. Wird nun CB(2) durch seinen selektiven Antagonisten JWH-015 inhibiert, so wird dadurch der CXCR4/CXCL12-Mechanismus blockiert, welcher für Tumorwachstum und Metastasierung verantwortlich ist (Nasser et al. 2011).

Die Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit ist, dass die derzeitige Standardtherapie des Glioblastoma multiforme, bestehend aus operativer Tumoresektion, gefolgt von Radiotherapie mit konkomitanter Chemotherapie mit Temozolomid, nach dem heutigen Stand der Forschung weiterer Optimierung bedarf.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die im Glioblastoma multiforme nachweisbaren Stammzellmarker Nestin, Musashi-1, CD133 und SOX-2 nicht temozolomidsensitiv reagieren und dass der Chemokinligand CXCL12/SDF-1 über seinen erst kürzlich entdeckten Rezeptor CXCR7 in der Lage ist, den apoptotischen Effekt von Temozolomid dosisabhängig zu reduzieren/aufzuheben. Dies müssen Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen sein, um schließlich das Glioblastoma multiforme nicht nur palliativ, sondern kurativ therapieren zu können. C6-Zellen stellen dafür aufgrund ähnlicher Eigenschaften wie humane Gliomzellen *in vitro* als auch *in vivo* an Wistar-Ratten ein gutes Modell für weiterführende Forschungen dar.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden im *in vivo*-Abschnitt 6 männlichen Wistar-Ratten mittels Stereotaxie C6-Gliomzellen in das linke Corpus striatum implantiert. Nach 10-tägiger Wachstumsphase der C6-Gliome wurden die Tiere in zwei Gruppen unterteilt. Die Therapietiere erhielten eine 1-wöchige Behandlung mit Temozolomid. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt. Anschließend wurde allen Tieren unter Narkose Hirnparenchym aus beiden Hemisphären entnommen. Daraus wurden die mRNA-Mengen von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, Musashi-1 und SOX-2 mittels Reverse Transcription mit anschließender Real-time PCR bestimmt. Hinsichtlich des Expressionsmusters und der Temozolomidsensitivität ließen sich drei Gruppen bilden. CXCR4 und Nestin zeigten therapieunabhängig deutliche Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen gesundem und erkranktem Gewebe. CXCR7 und Musashi-1 zeigten therapieunabhängig im Allgemeinen nur geringe Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen gesunder und erkrankter Hemisphäre. CXCL12, CD133 und SOX-2 zeigten bei den Therapietieren nur geringe Unterschiede des Expressionsmusters von gesunder und tumoröser Hemisphäre, bei den Kontrolltieren deutlichere.

Der *in vitro*-Abschnitt untersuchte isoliert das Expressionsverhalten oben genannter Chemokine/Stammzellmarker von C6-Zellen unter Zugabe von Temozolomid, DMSO und unbehandelt. Es wurde das Proliferationsverhalten von C6-Zellen unter Temozolomidstimulus in verschiedenen Konzentrationen, SDF-1 und/oder DMSO 1%, jeweils in verschiedenen Kombinationen sowie das Apoptoseverhalten von C6-Zellen unter Zugabe von Temozolomid, SDF-1, DMSO 2% und CCX733, einem CXCR7 Antagonisten, untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass CXCR4, CXCR7 und CXCL12 auf den Temozolomidstimulus mit einer statistisch signifikanten Expressionssteigerung reagierten, während alle Stammzellmarker nicht signifikant reguliert wurden. Temozolomid reduzierte die Proliferation von C6-Zellen dosisabhängig. Dieser Effekt konnte bei gleichzeitiger Gabe von SDF-1 bei niedrigen Konzentration vollständig, bei höheren Temozolomidkonzentrationen deutlich reduziert werden. Der apoptotische Effekt von Temozolomid auf C6-Zellen stieg dosisabhängig an. Die zusätzliche Gabe von SDF-1 wirkte antiapoptotisch. Der selektive CXCR7-Antagonist CCX733 antagonisierte diesen Effekt. Diese Befunde zeigen Ansatzpunkte auf, die

es zukünftigen Studien ermöglichen, die Therapie des Glioblastoma multiforme weiter zu verbessern.

7. Literaturverzeichnis

Angelastro JM, Lamé MW (2010)

Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells
Mol Cancer Res. 2010 Aug; 8(8): 1105-1115. Epub 2010 Jul 27.

Bailey P, Cushing H (1926)

A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a correlated Study of Prognosis
Philadelphia Lippincot

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005)

The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes
J Biol Chem. 2005 Oct 21; 280(42): 35760-35766. Epub 2005 Aug 17.

Barker M, Hoshino T, Gurcay O, Wilson CB, Nielsen SL, Downie R, Eliason J (1973)

Developement of an animal brain tumor model and its response therapy with 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea
Cancer Res 33: 976-986

Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, Dietrich PY, Dirix LY, Macdonald D, Heimans JJ, Zonnenberg BA, Bravo-Marques JM, Henriksson R, Stupp R, Yue N, Bruner J, Dugan M, Rao S, Zaknoen S (2001)

Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse
Ann Oncol 2001 Feb; 12(2): 259-266

Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J (2007)

Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi
J Cutan Pathol. 2007 May; 34(5): 370-375

Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006)

A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development

J Exp Med. 2006 Sep 4; 203(9): 2201-13. Epub 2006 Aug 28.

Bustin SA (2000)

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction

J Mol Endocrinol 25: 169-193

Chomczynski P, Sacchi N (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction

Anal Biochem 1987 Apr; 162(1): 156-159

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I (1997)

Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived-factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1

EMBO J 1997 Dec 1; 16(23): 6996-7007

Daga A, Bottino C, Castriconi R, Gangemi R, Ferrini S (2011)

New Perspectives in Glioma Immunotherap.

Curr Pharm Des. 2011 Aug 9. [Epub ahead of print]

Dahlstrand J, Zimmermann LB, McKay RDG, Lendahl U (1992a)

Charakterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments

J Cell Sci 103: 589-597

Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U (1992b)

Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system

Cancer Res 52: 5334-5341

D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J (1998)

Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis

Molecular Pharmacology; 54: 334-241

do Carmo A, Patricio I, Cruz MT, Carneiro H, Oliveira CR, Lopes MC (2010)

CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells

Cancer Biol Ther. 2010 Jan 17; 9(1). [Epub ahead of print]

Dresemann G (2010)

Temozolomide in malignant glioma

Onco Targets Ther. 2010 Sep 7; 3: 139-146

Dziembowska M, Tham TN, Lau P, Vitry S, Lazarini F, Dubois-Dalcq M (2005)

A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors

Glia. 2005 May; 50(3): 258-269

Ehrmann J, Kolár Z, Mokry J (2005)

Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours

J Clin Pathol. 2005 Feb; 58(2): 222-223

Fang X, Yoon JG, Li L, Yu W, Shao J, Hua D, Zheng S, Hood L, Goodlett DR, Foltz G, Lin B (2011)

The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis

BMC Genomics. 2011 Jan 6; 12:11

Fargeas CA, Huttner WB, Corbeil D (2007)

Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update
Tissue Antigens. 2007 Jun; 69(6): 602-606

Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O (1994)

Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas

Cancer Res. 1994 Jan 15; 54(2): 354-356

Fu J, Liu ZG, Liu XM, Chen FR, Shi HL, Pangjesse CS, Ng HK, Chen ZP (2009)

Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy

Chin Med J (Engl). 2009 Jun 5; 122(11): 1255-1259

Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G (2009)

SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity

Stem Cells. 2009 Jan; 27(1): 40-48

Gilbert CA, Ross AH (2009)

Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies

J Cell Biochem. 2009 Dec 1;108(5): 1031-1038

Goetz CG, Pappert EJ (2003)

Textbook of Clinical Neurology

W.B., Saunders Company: 933-955

Göttle P, Kremer D, Jander S, Odemis V, Engele J, Hartung HP, Küry P (2010)

Activation of CXCR7 receptor promotes oligodendroglial cell maturation

Ann Neurol. 2010 Dec; 68(6): 915-924

Grobbs B, De Deyn PP, Slegers H (2002)

Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion

Cell Tissue Res 310: 257-270

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990)

A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes

Nature 346 (6281): 245-250

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerköster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R (2010)

The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects

Cancer Res 2010 Apr 15; 70(8): 3299-308. Epub 2010 Apr 13.

Held-Feindt J, Rehmke B, Mentlein R, Hattermann K, Knerlich F, Hugo HH, Ludwig A, Mehdorn HM (2008)

Overexpression of CXCL16 and its receptor CXCR6/Bonzo promotes growth of human schwannomas

Glia. 2008 May; 56(7): 764-774

Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhilber ML, Likacs NW, Colletti LM, Simpson KJ, Strieter RM, Kinkel SL (1999)

Novel CXCR2-dependent liver regeneration qualities of ELR-containing CXC chemokines

FASEB J 13: 1565-1574

Hou KL, Hao MG, Bo JJ, Wang JH (2010)

CXCR7 in tumorigenesis and progression

Chin J Cancer. 2010 Apr; 29(4): 456-459

Huang X, Shen J, Cui M, Shen L, Luo X, Ling K, Pei G, Jiang H, Chen K (2003)

Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor

Biophys J 2003 Jan; 84(1):171-84

Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, Uchida E, Korc M, Naito Z, Tajiri T (2009)

Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer

Hum Pathol. 2009 Feb ;40(2): 189-198. Epub 2008 Sep 16.

Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM (2007)

Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis

Cancer Res. 2007 Oct 1; 67(19): 9199-9206

Kleihues B, Burger PC, Scheithauer BW (1993)

The new WHO classification of brain tumors

Brain pathol 3: 255-268

Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC (1995)

Histopathology, classification, and grading of gliomas

Glia 15: 211-221

Kutlu O, Ross AE, Schaeffer EM, Gratzke C, Stief CG, Strong TD, Burnett AL, Hedlund P, Bivalacqua TJ (2011)

Increased expression of nestin in the major pelvic ganglion following cavernous nerve injury

Int J Impot Res. 2011 Oct 13. doi: 10.1038/ijir.2011.50. [Epub ahead of print]

Li H, Cherukuri P, Li N, Cowling V, Spinella M, Cole M, Godwin AK, Wells W, DiRenzo (2007)

Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors

Cancer Res 67: 501-510

Louis DN, Ohagaki N, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Juvet A, Schleithauer BW, Kleihues P (2007)

The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system

Acta Neuropathol 114: 97-109

Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M (1997)

Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis

Am J Pathol 151: 1105-1113

Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008)

Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades

J Neurooncol. 2008 Jan; 86(1): 31-45. Epub 2007 Jul 5

Maksym RB, Tarnowski M, Grymala K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, Czerny B, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ (2009)

The role of stromal-derived factor-1-CXCR7 axis in development and cancer.

Eur J Pharmacol. 2009 Dec 25;625(1-3):31-40. Epub 2009 Oct 14.

Matković A, Jelčić I, Negovetić L, Lupret V, Ferber D (1984)

Glioblastoma of the cerebrum. Clinical course of the disease with special reference to tumor site

Neurochirurgia (Stuttg). 1984 Nov; 27(6): 174-180

Matsumura S, Takagi K, Okuda-Ashitaka E, Lu J, Naritsuka H, Yamaguchi M, Ito S (2010)

Characterization of nestin expression in the spinal cord of GFP transgenic mice after peripheral nerve injury

Neuroscience. 2010 Oct 27; 170(3): 942-953. Epub 2010 Jul 29.

McLendon RE, Rich JN (2011)

Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View

J Oncol. 2011; 2011: 397195. Epub 2010 Nov 1.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ (2007)

CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 2; 104(40): 15735-15740. Epub 2007 Sep 26.

Michalczyk K, Ziman M (2005)

Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation

Histol Histopathol. 2005 Apr; 20(2): 665-671

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997)

A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning

Blood. 1997 Dec 15; 90(12): 5013-5021

Moots PL, Maciunas RJ, Eisert DR, Parker RA, Laporte K, Abou-Khalil B (1995)

The course of seizure disorders in patients with malignant gliomas

Arch Neurol. 1995 Jul; 52(7): 717-724

Mühlhardt C (1999)
Der Experimentator: Molekularbiologie 1. Auflage
Gustav Fischer Verlag (Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm)

Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, Smith D, Shilo K, Zou X, Ganju RK (2011)

Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion

PLoS One. 2011; 6(9): e23901. Epub 2011 Sep 7.

Newlands ES, Blackledge GRP, Slack JA, Rustin GJS, Smith DB, Stuart NSA, Quarterman CP, Hoffman R, Stevens MFG, Brampton MH, Gibson AC (1992)

Phase 1 trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856)

Br J Cancer 1992; 65: 287-291

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991)

A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry

J Immunol Methods. 1991 Jun 3; 139(2): 271-279

Ohagaki H, Kleihues P (2005)

Epidemiology and etiology of gliomas

Acta Neuropathol 109: 93-108

Ohyama T, Furukawa A, Mashima T, Sugiyama T, Ohgara S, Yamazaki T, Imai T, Okano H, Nagata T, Katahira M (2008)

Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information

Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 2008; (52): 193-194

Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG 3rd, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-USmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE (2010)

Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain

J Biol Chem. 2010 Dec 17; 285(51): 39759-39767. Epub 2010 Sep 24.

Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R (2004)

Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients

Clin Cancer Res 2004 Jun 1; 10(11): 3728-3736

Paxinos G, Watson C (1986)

The rat brain in stereotactic coordinates (second edition)

Academic Press, San Diego, USA

Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann KG (2005)

Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia

Neuroscience. 2005; 136(4): 1133-1146. Epub 2005 Oct 10.

Qingyu Z, Guo P, Kruh GD, Vicini P, Wang X, Gallo JM (2007)

Predicting human tumor drug concentrations from a preclinical pharmacokinetic model of temozolomide brain disposition

Clin Cancer Res 2007 Jul; 13(14): 4271-4279

Rahman M, Deleyrolle L, Vedam-Mai V, Azari H, Abdel-Barr M, Reynolds BA (2010)

The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls
Neurosurgery. 2010 Dec 22. [Epub ahead of print]

Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA (2000)

Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma
Clin Cancer Res 2000 Jan; 6(1):102-111

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual (second edition)
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA

Schönemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R (2008)

Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain
J Comp Neurol. 2008 Sep 10; 510(2): 207-220

Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Miltatovic S, Damme J, Richmond A (2007)

Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells
Eur Cytokine Netw. 2007 June; 18(2): 59-70

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Damme JV, Walz A, Marriot D, Chan S-Y, Roczniak S, Shanafelt AB (1995)

The functional role of ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis
J Biol Chem 270: 27348-27357

Stummer W, Novotny A, Stepp A, Goetz C, Bise K, Reulen HJ (2000)

Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients

J Neurosurg; 93(6): 1003-1013

Stummer W, Steiger HJ (2002)

Resection of glioblastoma

J Neurosurg 96(4): 809-810

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005)

Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma

N Engl J Med. 2005 Mar 10; 352(10): 987-996

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2009)

Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial

Lancet Oncol. 2009 May;10(5): 459-466. Epub 2009 Mar 9.

Sureban SM, May R, George RJ, Dieckgraefe BK, McLeod HL, Ramalingam S, Bishnupuri KS, Natarajan G, Anant S, Houchen CW (2008)

Knockdown of RNA binding protein musashi-1 leads to tumor regression in vivo

Gastroenterology. 2008 May; 134(5): 1448-1458. Epub 2008 Mar 4.

Terasaki M, Sugita Y, Arakawa F, Okada Y, Ohshima K, Shigemori M (2011)

CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target

Brain Tumor Pathol. 2011 Jan 6. [Epub ahead of print]

Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn JC, Goldbrunner R (2010)

Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas

Mol Cell Neurosci. 2010 Jan; 43(1): 51-9. Epub 2008 Aug 7.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000)

Direct isolation of human central nervous system stem cells

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19; 97(26): 14720-14725.

Ulasov IV, Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS (2011)

Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy

Mol Med. 2011 Jan-Feb; 17(1-2): 103-112. Epub 2010 Oct 15.

Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T (2010)

Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis

Arthritis Rheum. 2010 Nov; 62(11): 3211-20. doi: 10.1002/art.27650.

Wright E, Snopek B, Koopman P (1993)

Seven new members of the sox gene family expressed during mouse development

Nucleic Acids Res 21 (3): 744

Yadav VR, Sung B, Prasad S, Kannappan R, Cho SG, Liu M, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010)

Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor

J Mol Med (Berl). 2010 Dec; 88(12): 1243-1253. Epub 2010 Aug 27.

Yang TM, Wang HC, Lin YJ, Lin WC, Lu CH, Chang WN, Chang HW, Ho JT (2008)

Radiotherapy followed by adjuvant temozolomide treatment of malignant glioma
Surg Neurol. 2008 Dec; 70 Suppl 1: S1: 60-63

Yung WK (2000)

Temozolomide in malignant gliomas
Semin Oncol 2000 Jun; 27(3 Suppl6): 27-34

Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali M, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW (2006)

Hypoxia-inducible factor-1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion
Laboratory investigation (2006) 86: 1221-1232

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC (2008)

Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients
Clin Cancer Res. 2008 Jan 1; 14(1): 123-129

Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, Ren GS (2010)

Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells
J Exp Clin Cancer Res. 2010 Apr 11; 29:31

8. Anhang

8.1. Ausführliche tabellarische Darstellung der Ergebnisse

8.1.1. *In vivo* - Ermittlung des Expressionsverhaltens von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene in C6-Gliomen sowie im gesunden Hirngewebe mit und ohne Temozolomid-Therapie (siehe 4.1.)

Tabelle 16: Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene im *in vivo*-Versuch. Dargestellt sind die Δ CT-Werte und $\Delta\Delta$ CT-Werte bei den Therapietieren (T1-T4) und den Kontrolltieren (K1-K2), jeweils vom gesunden Hirnparenchym (Hirn) und vom Tumorgewebe (Tumor). $\Delta\Delta$ CT stellt die Induktion der Expression dar.

		CXCR4	CXCR7	CXCL12
T1 Hirn	Δ CT	7,02	6,78	4,95
T1 Tumor	Δ CT	3,49	6,70	4,37
	$\Delta\Delta$ CT	11,5514336	1,05701804	1,49484925
T2 Hirn	Δ CT	8,26	5,58	4,67
T2 Tumor	Δ CT	5,25	8,31	5,16
	$\Delta\Delta$ CT	8,0556444	0,15072598	0,7120251
T3 Hirn	Δ CT	9,48	6,21	4,72
T3 Tumor	Δ CT	7,32	5,58	3,35
	$\Delta\Delta$ CT	4,46914855	1,54756499	2,58470566
T4 Hirn	Δ CT	7,63	6,22	3,81
T4 Tumor	Δ CT	7,90	5,93	4,00
	$\Delta\Delta$ CT	0,82931955	1,22264028	0,87660572
K1 Hirn	Δ CT	9,30	6,21	3,97
K1 Tumor	Δ CT	4,60	5,49	2,54
	$\Delta\Delta$ CT	25,9920767	1,64718203	2,69446715
K2 Hirn	Δ CT	8,48	6,47	4,76
K2 Tumor	Δ CT	6,37	5,60	3,50
	$\Delta\Delta$ CT	4,31691295	1,8276629	2,39495741

		Musashi-1	Nestin	CD133	SOX-2
T1 Hirn	Δ CT	4,70	10,46	6,14	10,08
T1 Tumor	Δ CT	5,18	8,52	5,63	9,72
	$\Delta\Delta$ CT	0,71697762	3,83705648	1,4240502	1,2834259
T2 Hirn	Δ CT	4,48	10,06	6,17	9,76
T2 Tumor	Δ CT	9,84	6,17	8,58	10,97

	$\Delta\Delta CT$	0,02434889	14,825409	0,18815584	0,43226862
T3 Hirn	ΔCT	5,65	11,10	7,20	10,91
T3 Tumor	ΔCT	5,09	9,83	6,31	9,70
	$\Delta\Delta CT$	1,47426922	2,41161566	1,85317612	2,31337637
T4 Hirn	ΔCT	5,07	10,26	6,52	9,91
T4 Tumor	ΔCT	4,88	9,77	5,73	9,84
	$\Delta\Delta CT$	1,14076372	1,40444488	1,72907446	1,04971668
K1 Hirn	ΔCT	5,49	10,65	7,12	10,51
K1 Tumor	ΔCT	4,81	8,48	5,67	9,24
	$\Delta\Delta CT$	1,60213976	4,50023394	2,73208051	2,41161566
K2 Hirn	ΔCT	5,02	11,39	7,37	11,11
K2 Tumor	ΔCT	4,24	9,25	5,10	9,23
	$\Delta\Delta CT$	1,71713087	4,40762046	4,82323131	3,6807506

8.1.2. *In vitro* - Ermittlung des Expressionsverhaltens von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 in unstimulierten, mit Temozolomid stimulierten und mit DMSO behandelten C6-Zellen (siehe 4.2.1.)

Tabelle 17: Expressionsverhalten von CXCR4, CXCR7, CXCL12, CD133, Nestin, SOX-2 und Musashi-1 auf mRNA-Ebene im *in vitro*-Versuch. Dargestellt sind die ΔCT -Werte und $\Delta\Delta CT$ -Werte. Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: Dimethylsulfoxid 0,1% (DMSO 0,1%), Temozolomid 20 μ g/ml (Tem20), Induktion der Expression Temozolomid 20 μ g/ml zu Dimethylsulfoxid 0,1% (Tem20/DMSO 0,1%), undetektierbare ΔCT -Werte (-). Die Mittelwerte der Induktion (MW) und dazugehörigen Standardabweichungen (SD) wurden aus den drei Versuchsdurchläufen ermittelt.

Versuchsdurchlauf 1:

		CXCR4	CXCR7	CXCL12
C6-Zellen, unstimuliert	ΔCT	14,84	9,22	8,63
C6-Zellen, DMSO 0,1%	ΔCT	14	9,47	8,32
C6-Zellen, Tem20	ΔCT	13,33	8,42	7,59
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta CT$	1,59107297	2,07052985	1,65863909

		Musashi-1	Nestin	CD133	SOX-2
C6-Zellen,					

unstimuliert	Δ CT	12,6	4,11	16,95	7,51
C6-Zellen, DMSO 0,1%	Δ CT	12,66	4,64	19,25	7,54
C6-Zellen, Tem20	Δ CT	12,13	3,83	16,62	7,71
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta$ CT	1,4439292	1,75321144	6,19025997	0,88884268

Versuchsdurchlauf 2:

		CXCR4	CXCR7	CXCL12
C6-Zellen, unstimuliert	Δ CT	13,32	8,93	10,8
C6-Zellen, DMSO 0,1%	Δ CT	13,49	9,21	11,48
C6-Zellen, Tem20	Δ CT	13,09	8,51	10,07
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta$ CT	1,31950791	1,62450479	2,65737163

		Musashi-1	Nestin	CD133	SOX-2
C6-Zellen, unstimuliert	Δ CT	12,88	4,64	17,66	-
C6-Zellen, DMSO 0,1%	Δ CT	12,77	4,88	-	-
C6-Zellen, Tem20	Δ CT	11,98	4,84	-	-
					-
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta$ CT	1,72907446	1,02811383	-	-

Versuchsdurchlauf 3:

		CXCR4	CXCR7	CXCL12
C6-Zellen, unstimuliert	Δ CT	15,76	9,16	10,33
C6-Zellen, DMSO 0,1%	Δ CT	15,92	8,78	10,6
C6-Zellen, Tem20	Δ CT	15,36	7,65	8,89
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta$ CT	1,47426922	2,1885874	3,27160823

		Musashi-1	Nestin	CD133	SOX-2
C6-Zellen, unstimuliert	Δ CT	12,36	5,32	17,87	6,48
C6-Zellen, DMSO 0,1%	Δ CT	11,75	5,9	17,93	6,81
C6-Zellen, Tem20	Δ CT	12,05	6,04	16,71	6,27
Induktion Tem20/DMSO 0,1%	$\Delta\Delta$ CT	0,8122524	0,90751916	2,32946717	1,45397252

Marker	MW der Induktion	SD
CXCR4	1,461616699	0,136223932
CXCR7	1,961207348	0,297507738
CXCL12	2,529206318	0,814086681
Musashi-1	1,328418685	0,469198981
Nestin	1,229614808	0,457439444
CD133	4,259863574	2,729992771
SOX-2	1,171407599	0,399607139

8.1.3. Proliferationsverhalten von C6-Zellen (siehe 4.2.2.)

Tabelle 18: Proliferationsverhalten von C6-Zellen im *in vitro*-Versuch. Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: SDF-1 1nM (SDF-1), Dimethylsulfoxid 1% (DMSO 1%), Temozolomid 20µg/ml (Tem20), Temozolomid 100µg/ml (Tem100). Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind jeweils in Prozent (%) angegeben.

Stimulus	MW in %	SD in %
unstimuliert	100	1,2
SDF-1	99,7	6,4
DMSO 1%	93,1	5,8
SDF-1, DMSO 1%	102,8	5,2
Tem20	85,9	9,6
Tem20, SDF-1	107,2	2,8
Tem100	66,1	1,6
Tem100, SDF-1	83	5,6

8.1.4. Apoptoseverhalten von C6-Zellen (siehe 4.2.3.)

Tabelle 19: Apoptoseverhalten von C6-Zellen im *in vitro*-Versuch bei Gabe von Temozolomid.

Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: Dimethylsulfoxid 2% (DMSO 2%), Temozolomid 100µg/ml (Tem100), Temozolomid 200µg/ml (Tem200), Temozolomid 400µg/ml (Tem400), Temozolomid 600µg/ml (Tem600). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) sind jeweils in Prozent (%) dargestellt.

Stimulus	MW in %	SD in %
DMSO 2%	7,8	5,1
Tem100	26,7	13,6
Tem200	29,2	7,6
Tem400	26,2	9
Tem600	47,4	30

Tabelle 20: Apoptoseverhalten von C6-Zellen im *in vitro*-Versuch bei Gabe von Temozolomid,

SDF-1 und CCX733 in verschiedenen Kombinationen. Die Stimuli werden wie folgt abgekürzt: Dimethylsulfoxid 1% (DMSO 1%), SDF-1 1nM (SDF-1), CCX733 100nM (CCX733), Temozolomid 200µg/ml (Tem200). Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) sind jeweils in Prozent (%) dargestellt.

Stimulus	MW in %	SD in %
DMSO 1%	4	1,1
DMSO 1%, SDF-1	6	4,7
DMSO 1%, CCX733	5,6	2,7
DMSO 1%, SDF-1, CCX733	6,5	2,6
Tem200	69,8	13,2
Tem200, SDF-1	58	11,5
Tem200, CCX733	65,9	12,5
Tem200, SDF-1, CCX733	65,1	9,5

8.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Mehdorn für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel sowie seinem Interesse an dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Held-Feindt. Ihre außerordentlich engagierte Betreuung hat mir die Fertigstellung dieser Dissertation erst ermöglicht. Dafür möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Hattermann für die geduldige und stets sehr hilfsbereite Unterstützung während der Laborarbeiten bedanken.

Außerdem danke ich Frau Rehmke und Herrn Krause für die Unterstützung meiner Dissertation in fachlicher Hinsicht.

Schließlich danke ich meiner Familie, wobei mein spezieller Dank meinen Eltern und meinem Ehemann Patrick gilt.

8.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kristin Wollny, geb. Mrugalla

Geburtstag: 12. Oktober 1980

Geburtsort: Kiel

Familienstand: verheiratet

Eltern: Angela Mrugalla, Arzthelferin
Bruno Mrugalla, Industriekaufmann

Schulbildung

1987 - 1991 Fritz-Reuter Grundschule in Friedrichsort

1991 - 2000 Gymnasium Altenholz in Altenholz-Stift

23.06.2000 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Ausbildung

2000 - 2002 Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Dresdner Bank AG in Kiel
und in Hamburg

01.07.2002 Abschlussprüfung zur Bankkauffrau bei der IHK zu Kiel

Studium

2002 – 2007 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

15.03.2005 Zahnärztliche Vorprüfung

11.12.2007 Zahnärztliche Prüfung

13.12.2007 Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

2008 - 2010 Tätigkeit als Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis
Kirchmann und Westheide in Bad Bramstedt

seit 04.2010 Tätigkeit als angestellte Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. Herold in Appen

Zitable Abstracts

Hattermann K, Mrugalla K, Mentlein R, Held-Feindt J (2011)

Expression and regulation of CXCL12 and its receptors in rat C6 glioma cells.

Anatomische Gesellschaft 28. Arbeitstagung, Würzburg, 28. - 30. September 2011.

Abstract-Band p.21, Abstract P50.

Promotion

Die Untersuchungen, Experimente und Auswertungen zu dieser Arbeit fanden im Zeitraum von August 2010 – Januar 2011 statt.